Untersuchungen zur Primärstruktur des ß-LACTOGLOBULINS

GERHARD FRANK

910

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0060

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Prof. Dr. Adolf Butenandt

Untersuchungen zur Primärstruktur des ß-LACTOGLOBULINS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Dipl. Chem. Gerhard Frank
aus der
Freien und Hansestadt Hamburg

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Braunitzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer im Max-Planck-Institut für Biochemie in München ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt danke ich sehr für die großzügige Förderung meiner Arbeit und Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer für seine vielen Anregungen und Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	
I. ß-Lactoglobulin	
a. Darstellung	5
b. Charakterisierung durch Endgruppenbestimmungen	6
II. Tryptische Peptide des ß-Lactoglobulins	
a. Tryptische Spaltung	7
b. Chromatographische Trennung	11
III. Überlappungspeptide	
a. Das Prinzip	21
b. Peptische Spaltung und Peptidgewinnung	23
c. Chromatographische Reinigung	24
IV. Die Partialformel	
a. Einführung in die Zeichensprache	32
b. Begründung der Partialformel	33
V. Diskussion	
a. Betrachtung der Fehlermöglichkeiten	53
b. Betrachtungen zum Ergebnis	54

Seite

Experimenteller Teil

I. ß-Lactoglobulin, Gewinnung und Endgruppenbestimmungen

a. Darstellung von kristallisiertem ß-Lactoglobulin 56

b. Säulenchromatographische Reinigung von ß-Lactoglobulin 57

c. Endgruppenbestimmungen 58

II. Reaktionen am ß-Lactoglobulin (Gesamtprotein)

a. Aminoäthylierung des Cystins und Cysteins 59

b. Perameisensäureoxidation 60

c. Reduktion zu freien SH-Gruppen 61

III. Enzymatische Spaltungen am ß-Lactoglobulin

a. Tryptische Spaltung des AEC-Derivates 61

b. Peptische Spaltung des oxidierten und des reduzierten ß-Lactoglobulins 62

IV. Reinigungsmethoden für Peptide (Ionenaustauscherchromatographie)

a. Allgemeines 63

b. Dowex 1x2-Chromatographie 65

c. Kationenaustauscherchromatographie 66

V. Enzymatische Spaltungen an Peptiden

a. Probenvorbereitung 68

b. Tryptische Nachspaltung peptischer Peptide 69

c. Carboxypeptidase A 69

d. Aminopeptidase M 70

Zusammenfassung 71

Literaturverzeichnis 73

Einleitung

Nach dem heutigen Stande unseres Wissens bestehen die grundlegenden Lebensvorgänge aus einer Wechselwirkung zwischen Nucleinsäuren und Eiweißstoffen. Während die Nucleinsäuren ihre hauptsächliche Bedeutung in der Genetik und Proteinbiosynthese, also im Bereich der Information und deren Umsetzung, besitzen, sind die Eiweißstoffe, als direkte Genprodukte, die wichtigsten Träger funktioneller Aufgaben[+].

Die unterschiedlichen Möglichkeiten für Proteinfunktionen legen die Aufteilung in Funktionsgruppen nahe, die man wie folgt vornehmen kann:

1.) Eiweißstoffe mit dynamischer Funktion, wie Enzyme und Antikörper.

2.) Eiweißstoffe mit statischer Funktion, wie Strukturproteine und Speicherproteine.

3.) Eiweißstoffe, deren Funktion unbekannt ist, die möglicherweise zu einer der beiden ersten Gruppen gehören, oder aber gar keine funktionellen Eigenschaften haben.

Proteine ohne Funktion scheinen biologisch unsinnig, können aber zum Beispiel bei molekularen Krankheiten auftreten, wo infolge einer Mutation ein Enzym seine Aktivität verloren hat, jedoch weiter synthetisiert wird. War das Enzym nicht lebensnotwendig für die Art, so handelt es sich nicht um eine Krankheit im eigentlichen Sinne des Wortes, und der funktionslose Eiweißstoff kann als rudimentäres Protein über viele Generationen erhalten bleiben.

Soweit man Proteine der Gruppe 1.), die zweifellos die biologisch bedeutendste Gruppe ist, untersucht hat, zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Funktion von der Tertiär- und

---

[+] Da die Verwertung von Information ihrem Wesen nach auch Funktion ist, findet sich im Bereich der Proteinbiosynthese und deren Regulation ein lebhaftes Wechselspiel zwischen diesen beiden Stoffklassen. Eiweißstoffe sind Bestandteile der Gene, der Ribosomen und neueren Arbeiten zufolge auch der Repressoren. 1,2)

Quartärstruktur. Bei allosterisch reagierenden Proteinen hat die räumliche Anordnung des Moleküls offensichtlich eine viel weitergehende Aufgabe, als nur einige reaktive Aminosäuren zum "aktiven Zentrum" zusammenzuführen.

Trotz dieser großen Bedeutung der Überstrukturen scheint, nach unserem heutigen Wissen über die Proteinbiosynthese, nur die Primärstruktur der Eiweißstoffe in der genetischen Information enthalten zu sein. Das legt die Vermutung nahe, daß die Sequenz der Aminosäuren in der Kette den räumlichen Aufbau eines Proteins hinreichend determiniert. Die mögliche Selbstreaktivierung denaturierter Enzyme hat diese Theorie so weit erhärtet, daß sie allgemein anerkannt wird. Über Gesetzmäßigkeiten, nach denen die Sequenz die Ausbildung der Überstrukturen bewirkt, ist jedoch nichts bekannt. Sie zu finden setzt die gleichzeitige Kenntnis von Sequenz und räumlicher Struktur mehrerer Proteine als Mindestforderung voraus.

Röntgenstrukturanalyse zur Ermittlung der Überstrukturen und chemische Analyse zur Ermittlung der Sequenz eines Eiweißstoffes sind ihrem Wesen nach so verschieden, daß sie nicht von nur einem Arbeitskreis ausgeführt werden können. Diese Tatsache zwingt zur Zusammenarbeit, und ß-Lactoglobulin wurde unter anderem deswegen zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit, weil es auf Grund seiner guten Kristallisierbarkeit von David W. Green in Großbritanien zum Objekt der Röntgenstrukturanalyse gewählt wurde.

ß-Lactoglobulin ist ein globuläres Protein in der Kuhmilch (und der Milch anderer Paarhufer). Seine Darstellung wurde bereits 1934 von Palmer[3)] beschrieben, doch ist bis heute keine biologische Funktion dieses Eiweißstoffes bekannt, und er gehört damit nach der obigen Einteilung zur Funktionsgruppe drei. Die Zugehörigkeit zur Gruppe eins oder zwei ist damit zwar nicht ausgeschlossen, doch ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich beim ß-Lactoglobulin um ein rudimentäres Protein handelt.

Röntgenologische Daten von Green et al.[4], Untersuchungen in der Ultrazentrifuge von Timasheff und Townend[5], sowie die Aminosäureanalysen mehrerer Autoren[6,7,8], ergeben übereinstimmend ein Molekulargewicht von etwa 36 000 für ein Aggregat aus zwei gleichen Untereinheiten, die Erscheinungsform des ß-Lactoglobulins unter natürlichen Bedingungen. Von den Untereinheiten sind zur Zeit vier genetische Varianten bekannt, die vermutlich die Folge von Punktmutationen sind und interessante Ladungsunterschiede zeigen. Sie bilden die ß-Lactoglobuline A, B, C und D. Hybridisierungen zwischen diesen Proteinen wurden bisher weder bei heterozygoten Kühen noch unter künstlichen Bedingungen gefunden.

Endgruppenbestimmungen am N-Terminus und am C-Terminus wurden in der Arbeitsgruppe von Fraenkel-Conrat durchgeführt und ergaben Leu-Leu-Val am Anfang und Ile[9,10] am Ende der Proteinkette. Ferner haben Kalan et al.[11] und Townend[12] über Peptide aus jenem Bereich des Moleküls berichtet, in dem einer von zwei Unterschieden zwischen ß-Lactoglobulin A und ß-Lactoglobulin B liegt: im Falle A findet man eine Asparaginsäure, die im Falle B durch Glycin ersetzt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Partialformel der ß-Lactoglobuline A und B bestimmt. Sie gibt den Aufbau der Proteinkette aus einer Anzahl von Peptiden wieder, deren Reihenfolge in der Kette und deren Aminosäurezusammensetzung bekannt sind. Die Sequenz der Aminosäuren in den einzelnen Peptiden ist dabei in unterschiedlichem Maße, jedoch nicht für alle Peptide vollständig, gegeben.

Um zu dieser Partialformel zu gelangen, war es erstens notwendig, daß ß-Lactoglobulin enzymatisch (hier tryptisch) zu spalten, die Peptide chromatographisch zu trennen und dabei so viele zu erfassen, daß deren Aminosäureanalysen sich zur Aminosäureanalyse der Gesamtkette addieren ließen. Zweitens mußten durch neue Spaltung mit einem Enzym anderer Spezifität (hier Pepsin) Brückenpeptide gewonnen werden, durch die die relativen Lagen der tryptischen Peptide zu ermitteln waren.

In Hinblick auf die weitere Arbeit am ß-Lactoglobulin mußte der Reindarstellung der Peptide und den dabei erreichbaren Ausbeuten besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden, denn diese Peptide sind gleichzeitig das Ausgangsmaterial für die Sequenzermittlung in den Bereichen der Kette, welche die Partialformel nur als Bruttozusammensetzung angibt.

Allgemeiner Teil

I. ß-Lactoglobulin

a. Darstellung

Die Darstellung des Ausgangsmaterials für die späteren Versuche erfolgte nach einer Vorschrift von Robbins und Kronman[13]. Die verwendete Milch stammte vom Milchhof in München und enthielt, wie eine Papierelektrophorese des gewonnenen ß-Lactoglobulins zeigte, nur die Komponenten A und B. Diese unterscheiden sich durch den Austausch der Aminosäuren Asparaginsäure und Valin gegen Glycin und Alanin.

ß-Lactoglobulin A: 16 Asp, 10 Val, 3 Gly und 14 Ala.
ß-Lactoglobulin B: 15 Asp, 9 Val, 4 Gly und 15 Ala.

An Stelle der möglichen Reinigung durch mehrmaliges Umkristallisieren wurde der sicherere Weg einer chromatographischen Reinigung eingeschlagen. Dabei wurde auf eine Vorschrift von Piez et al. zurückgegriffen[7]. Eine Trennung der Komponenten wurde bei dieser Chromatographie nicht angestrebt, da dabei sehr viel Substanz verloren wird. Zudem ermöglicht es die Verwendung eines Gemisches für die Sequenzanalyse, ohne wesentliche Mehrarbeit die Positionen der Aminosäureaustausche zu erkennen.

Prüfungen auf Reinheit wurden an die Chromatographie nicht mehr angeschlossen, weil dafür nur noch die Elektrophorese in Frage gekommen wäre[+]. Die Papierelektrophorese hatte aber bereits beim Rohmaterial nur noch die beiden Banden des ß-Lactoglobulins A und B gezeigt.

[+] Die Aminosäureanalyse nach Stein und Moore, die häufig zur Charakterisierung von Proteinen herangezogen wird, ist kein geeignetes Mittel zur Reinheitskontrolle, da sie nur mit einer Reproduzierbarkeit von etwa ± 3 % arbeitet. Das reicht nicht aus, um Verunreinigungen festzustellen, die auch alle Aminosäuren des Hauptproduktes enthalten, wenn auch in anderen Mengenverhältnissen. So würde z.B. eine Verunreinigung des ß-Lactoglobulins mit Rinderserumalbumin erst dann durch eine signifikante Änderung in mehr als einer Aminosäure auffallen, wenn das Serumalbumin zu mehr als 10 % vorhanden wäre.

b. Charakterisierung durch Endgruppenbestimmungen

Bei Proteinpräparationen kann es vorkommen, daß endständige Aminosäuren abgespalten werden, ohne daß sich die Eigenschaften des Restes dadurch merklich von denen des Gesamtproteins unterscheiden. Da Endgruppenbestimmungen vom ß-Lactoglobulin bereits beschrieben sind, kann man mit ihrer Hilfe leicht die Identität des eigenen Präparats mit den in der Literatur beschriebenen überprüfen.

1.) Best. der N-terminalen Aminosäure nach Stark und Smyth[14].

Freie Aminogruppen des Proteins werden mit Kaliumcyanat umgesetzt, dann wird das "Carbamylprotein" mit Säure erhitzt, wobei die N-terminale Aminosäure als Hydantoin abgespalten wird. Das Hydantoin wird über eine Ionenaustauschersäule von den Aminosäuren abgetrennt, mit Natronlauge zur freien Aminosäure hydrolysiert und als solche nachgewiesen.
Es wurde nur Leucin gefunden.

2.) Best. der C-terminalen Aminosäure mittels Hydrazinolyse.

Das Protein wird mit wasserfreiem Hydrazin umamidiert, wobei von allen Aminosäuren, mit Ausnahme der C-terminalen, die Hydrazide entstehen. Diese werden mit Benzaldehyd in die Schiff'schen Basen überführt und lassen sich als solche mit Äther ausschütteln. Die wässrige Phase wird analysiert.
Es wurde Isoleucin gefunden.

3.) Best. der C-terminalen Aminosäure mit Carboxypeptidase.

Die Behandlung des Präparates mit Carboxypeptidase führte zur Abspaltung von Isoleucin und Histidin im Verhältnis von ungefähr 2:1. Daraus kann geschlossen werden, daß Histidin die vorletzte Position in der Proteinkette einnimmt. Die terminale Stellung des Isoleucins wird bestätigt.

Ergebnis: Sämtliche Befunde über die N- und C-terminalen Aminosäuren des Präparates stimmen mit den in der Literatur für das ß-Lactoglobulin angegebenen überein.

II. Tryptische Peptide des ß-Lactoglobulins

a. Die tryptische Spaltung

Von allen bekannten Endopeptidasen hat Trypsin die größte Spezifität. Es spaltet fast ausschließlich hinter Lysin und Arginin, so daß man aus der Gesamtanalyse eines Proteins auf die Anzahl der tryptischen Spaltprodukte schließen kann. Solche Arithmetik wird nur durch vier Umstände gestört:

1.) Trypsin spaltet nicht vor Prolin.
2.) Trypsin spaltet häufig schlecht vor Asparaginsäure.
3.) In einigen Fällen, deren Ursachen zur Zeit nicht geklärt sind, spaltet Trypsin mit guten Ausbeuten hinter Tyrosin.
4.) Sind im Protein Disulfidbrücken vorhanden, so können tryptische Peptide dadurch zusammengehalten werden und als ein Einziges erscheinen. Im alkalischen Milieu (Bedingung für tryptische Spaltung) vorhandene Gleichgewichte wie

$$2\ R_1\text{-S-S-}R_2 \rightleftharpoons R_1\text{-S-S-}R_1 + R_2\text{-S-S-}R_2$$

verursachen in diesem Falle zusätzliche Schwierigkeiten.

Die Eigenschaften des Enzyms lassen sich zur Zeit nicht ändern, doch wurde Punkt 4 durch Überführung des Ausgangsmaterials in Derivate ohne Disulfidbrücken gegenstandslos gemacht.

Mit und neben der Zerstörung der Disulfidbrücken ändern sich jedoch auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gesamtproteins und der daraus entstehenden Peptide. Diese Änderungen wirken sich, abhängig von der Art des verwendeten Derivates, teils vorteilhaft und teils nachteilig auf die Gewinnung und weitere Behandlung der tryptischen Peptide aus. Durch Verwendung verschiedener Derivate nebeneinander wurde es möglich, die Nachteile der einzelnen Produkte wettzumachen.

Folgende Derivate wurden verwendet:

1.) mit Perameisensäure oxidiertes Protein (O-Derivat), in dem Cystin und Cystein in Cysteinsäure und Methionin in Methioninsulfon überführt sind.

Vorteile: Sehr gute Löslichkeit der cysteinsäurehaltigen Peptide. Dadurch führt die Spaltung zu einem völlig löslichem Peptidgemisch.
Nachteile: Tryptophan wird zerstört und kann in den Peptiden nicht mehr nachgewiesen werden. In einigen Fällen wird aus Asparagin und Glutamin Ammoniak abgespalten. Das Auftreten mehrerer stark saurer Peptide kann deren Reingewinnung erschweren.

2.) mit ß-Mercapto-äthanol in 8 molarem Harnstoff reduziertes und dann mit Jodacetamid alkyliertes Protein (R-Derivat), in dem Cystin und Cystein in das Amid des S-Carboxymethyl-cysteins überführt sind.

Vorteile: Die Methode ist sehr schonend. Veränderungen anderer Aminosäuren auch des Tryptophans werden nicht beobachtet.
Nachteile: Die Löslichkeit cysteinhaltiger Peptide wird stark herabgesetzt. Durch während der Spaltung ausfallendes Material wird diese unvollständig.

3.) mit ß-Mercapto-äthanol in 8 molarem Harnstoff reduziertes und dann mit Aziran alkyliertes Protein (A-Derivat), in dem Cystin und Cystein in S-Aminoäthylcystein (abgek.: AEC) überführt sind. Methode nach Raftery und Cole[15] variiert.

Besonderes: AEC unterscheidet sich von Lysin nur dadurch, daß es an Stelle einer CH_2-Gruppe zweibindigen Schwefel enthält. Trypsin spaltet, da dieser Unterschied nur gering ist, auch hinter AEC, jedoch mit etwas niedrigerer Geschwindigkeit.

Vorteile: AEC-haltige Peptide sind gut löslich. Die Methode ist sehr schonend, so daß alle anderen Aminosäuren unverändert bleiben.
Nachteile: AEC ist nicht gut haltbar. Die Anzahl der tryptischen Peptide wird größer und die Aufstellung der Partialformel wird dadurch erschwert.

Die erhaltenen Derivate mußten auf Vollständigkeit der jeweiligen Umsetzung geprüft werden. Cysteinsäure und Carboxylmethyl-cystein, Produkte saurer Hydrolyse der Derivate O und R, lassen sich mittels der Aminosäureanalyse nach Stein und Moore nicht genau quantitativ erfassen, da sie von dem sauren Austauscher des Analysators zu einem Zeitpunkt zu dem das System noch nicht völlig equilibriert ist vor allen anderen Aminosäuren eluiert werden. Als Kriterium für vollständige Umsetzung wurde deswegen die Abwesenheit von Cystin und Cystein herangezogen. Danach betrug die Umsetzung in beiden Fällen über 99 %.

Das AEC konnte bei der Auftrennung der basischen Aminosäuren auf der 15 cm Säule des Analysators vom Lysin abgetrennt werden. Es erschien zwischen Lysin und Histidin, und der Anfärbefaktor entsprach erwartungsgemäß dem des Lysins. Die nebenstehende Analyse der basischen Aminosäuren aus dem A-Derivat bestätigt, in den Fehlergrenzen der Methode von 3 %, die vollständige Umsetzung des Cystin und Cysteins. Für den Fall des ß-Lactoglobulins erweist sich die Analyse des A-Derivates hiermit als genauestes Verfahren zur Cysteinbestimmung.

Lys	0,801 µmole	15,05
AEC	0,268 µmole	5,04
His	0,106 µmole	1,99
Arg	0,155 µmole	2,92

Alle Derivate konnten, da sie bei ihrer Darstellung bereits hinreichend denaturiert worden waren, direkt zur tryptischen Spaltung verwendet werden, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, wie sie für Human-Globin üblich sind[16]. Nach der Spaltung beim R- und, in ganz geringem Maße, beim A-Derivat vorhandene Niederschläge wurden abzentrifugiert, und nur der Überstand wurde zur Peptidgewinnung verwendet.

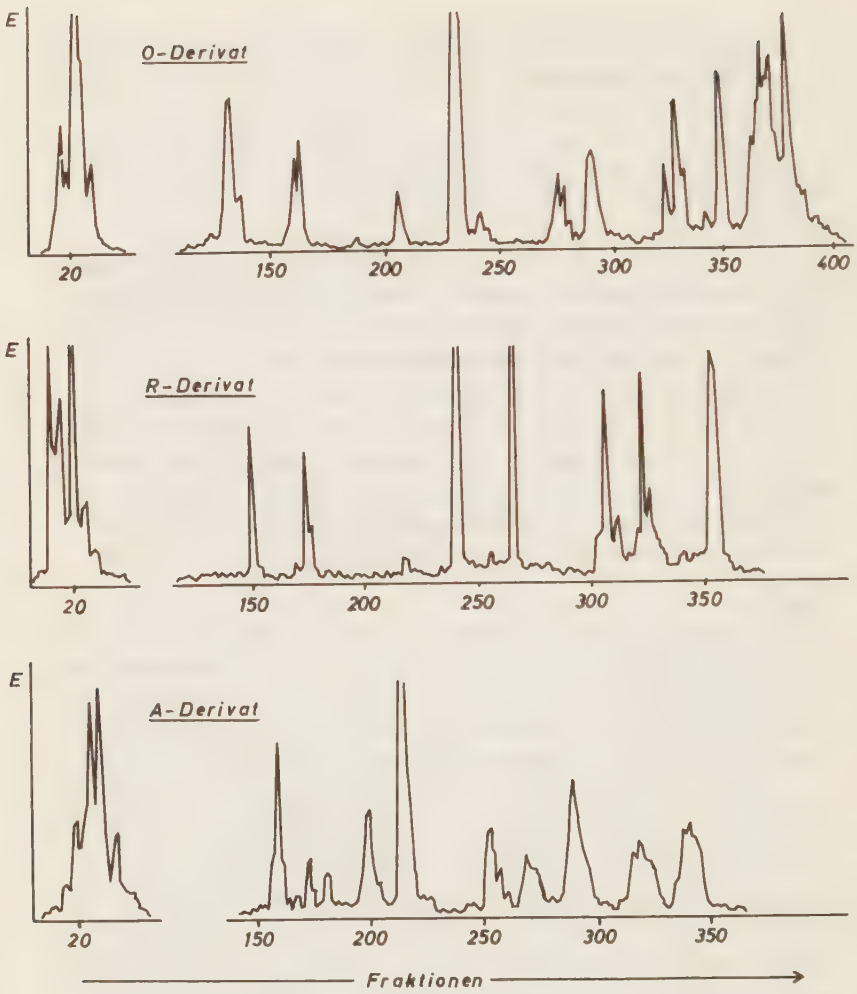


Abb. 1: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide aus dem O-, R- und A-Derivat über Dowex 1x2.
Ausgezogene Linie: Ninhydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse.
Einzelheiten siehe experimenteller Teil.

b. Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung von so komplexen Gemischen, wie sie bei tryptischer Spaltung größerer Proteinuntereinheiten anfallen, gelingt erfahrungsgemäß nicht in einem Schritt. Eine Vortrennung wurde durch Säulenchromatographie über Dowex 1x2 mit modifizierten Gradienten nach der Methode von V. Rudloff und G. Braunitzer[17] erreicht. (Abb.: 1) Die Gipfelfraktionen wurden eingeengt und aliquote Teile daraus papierchromatographisch im Partridge-System untersucht. Die so erhaltenen Übersichtschromatogramme zeigen die Abb. 2 bis 4.

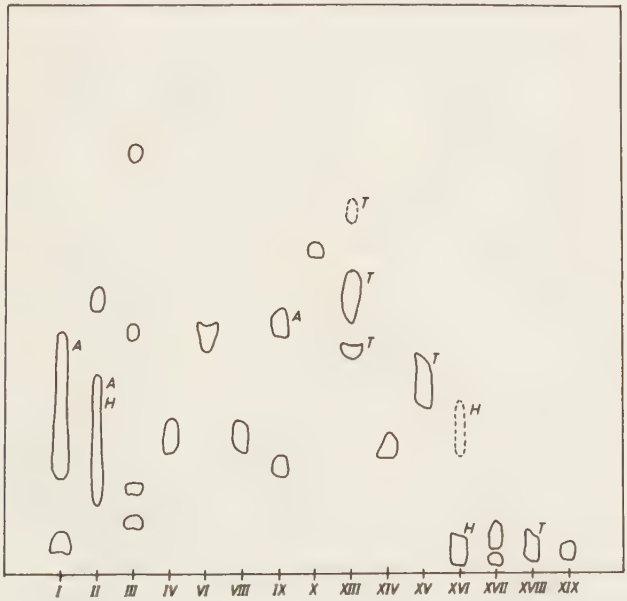


Abb. 2: Übersichtschromatogramm vom O-Lauf. Gegeben sind alle ninhydrinpositiven Flecken. Mit spezifischen Sprühreagentien 18) erhaltene Farbreaktionen wurden folgendermaßen bezeichnet: A = Arginin, H = Histidin, E = Tryptophan und T = Tyrosin.

Die Übersichtschromatogramme sind eine wertvolle Hilfe bei der Säulenchromatographie der Peptidgemische aus den Gipfeln der Dowex-1-Chromatographie, die als Rechromatographie bezeichnet wird. Sie zeigen einerseits, wieviel Peptide bei den Rechromatographien mindestens zu erwarten sind und andererseits ist es möglich zu erkennen, wenn in den O-, R- und A-Läufen gleiche Peptide auftreten. Im letzteren Falle braucht häufig nur der Gipfel aus einem Lauf rechromatographiert werden.

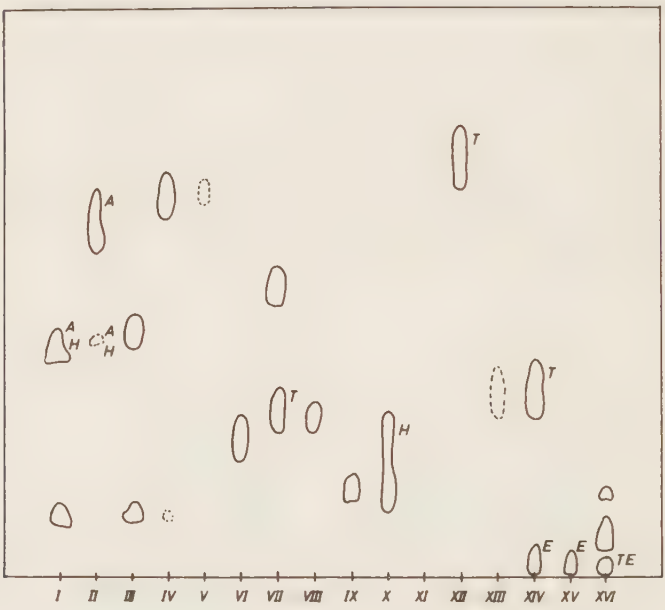


Abb. 3: Übersichtschromatogramm von R-Lauf. Bezeichnung der Farbreaktionen wie bei Abb. 2.

Die große Zahl der bei diesem Verfahren anfallenden Gipfelfraktionen macht eine systematische Benennung notwendig, die wie folgt durchgeführt wurde: Je nach verwendetem Derivat des ß-Lactoglobulins beginnt die Bezeichnung mit O, R oder A.

Darauf folgt eine römische Zahl, die aus der fortlaufenden Numerierung der Gipfel von der Dowex-1-Chromatographie stammt. Die Gipfel der Rechromatographie werden mit a beginnend, durch kleine lateinische Buchstaben bezeichnet, die als drittes Symbol zur Benennung der Gipfelfraktionen angehängt werden. R XIVd bedeutet also: Aus dem R-Derivat gewonnenes Peptid, welches bei der Dowex-1-Chromatographie im 14. Gipfel und bei dessen Rechromatographie im 4. Gipfel auftrat.

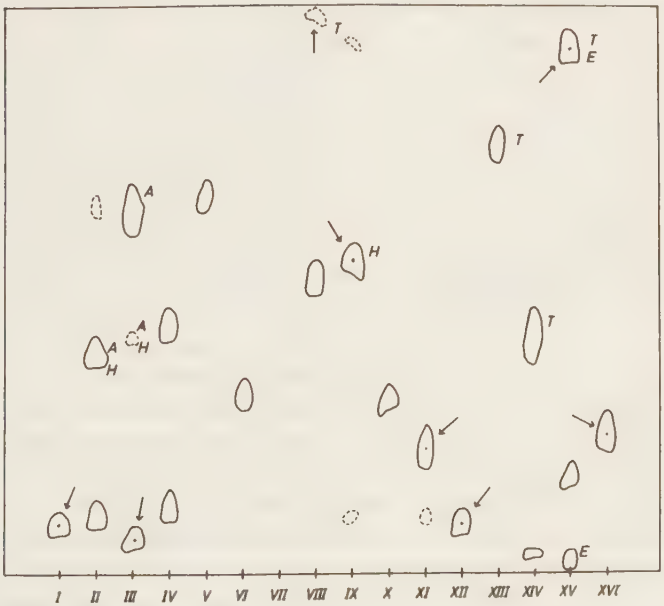


Abb. 4: Übersichtschromatogramm vom A-Lauf. Unterschiede gegenüber dem R-Lauf sind durch einen Punkt im Fleck markiert. Farbreaktionen wie bei Abb. 2.

Zu den Rechromatographien wurden Säulen mit phosphorylierter Cellulose verwendet, wenn nicht die Möglichkeit bestand, daß eines der zu trennenden Peptide Cysteinsäure enthielt. Die Anwesenheit von Cysteinsäure macht die Verwendung des, etwas schlechter zu handhabenden, Dowex 50x2 notwendig, da

bei phosphorylierter Cellulose Umesterungen stattfinden können, durch welche die Peptide homöopolar an die Cellulose gebunden werden.

$$\text{Cellulose-O-PO}_3\text{H}' + \text{R-SO}_3' \longrightarrow \text{Cellulose-O-SO}_2\text{-R} + \text{HPO}_4''$$

Die Rechromatographien wurden paarweise durchgeführt, wobei die Verwendung einer Schlauchpumpe mit zwei gleichen Schläuchen die gleichen Elutionsbedingungen (auch bei Schwankungen im Gleichlauf der Pumpe) gewährleistete. Durch Verwendung eines einzigen Gradientensystems für beide Säulen und eines doppelreihigen Fraktionssammlers für die Fraktionierung wurde völlige Vergleichbarkeit der einzelnen Fraktionen erreicht. Am nebenstehenden Beispiel, (Abb. 6) der Rechromatographie von R I und R II zeigt sich der Vorteil dieser Methode. Man erkennt sofort, daß R I eine geringe Menge R IIa enthält und R II noch eine erhebliche Menge R Ib. (Vergl. auch Übersichtschromatogramm). Die Gipfel der Rechromatographien enthielten, wie die papierchromatographische Prüfung ergab, fast immer reine Peptide die nach saurer Hydrolyse mit einem automatischen Aminosäureanalysator auf ihre Bruttozusammensetzung analysiert wurden.

Abb. 5: Rechromatographien der Gipfel R I und R II über phosphorylierte Cellulose als Parallellauf.
Versuchsbedingungen:
Säulengröße: 30 x 1 cm
Elutionsmittel: Gradientensystem mit Pyridin-Formiat.
Ausgezogene Kurve: Ninihydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse.

Die dabei für jede Aminosäure erhaltenen Mikromol-Mengen zeigen, innerhalb der durch die Analysenfehler bedingten Grenzen, ganzzahlige Verhältnisse und lassen sich mittels Division durch ein "Gemeinschaftliches Vielfaches" in Verhältniszahlen überführen, die von ganzen Zahlen nur wenig abweichen. Tabelle 1 gibt diese Verhältniszahlen für alle analysierten tryptischen Peptide wieder.

Größere Abweichungen finden sich erfahrungsgemäß bei den Aminosäuren Lysin (wird bei Analyse auf der 7 cm Säule häufig zu groß) und Prolin (bildet mit dem Ninhydrin-Reagenz keinen blauen Farbstoff und die Messung des gelben Produktes bei 440 nm ist mit größeren Fehlern behaftet). Die für R XIVd und R XVIf gefundenen Lysin-Werte liegen jedoch außerhalb dieser Toleranz. Es handelt sich in diesen Fällen um Gemische zweier Peptide, die sich jeweils nur um ein Lysin unterscheiden[+]. Die chromatographischen Eigenschaften der Peptide werden offenbar durch den hohen Gehalt an Glutaminsäure so sehr beeinflußt, daß trotz des, durch Lysin bedingten, Ladungsunterschiedes keine Trennung erreicht wird.

Ein Sonderfall liegt bei dem Peptid O XVIIIb vor. Die Werte für Alanin (1,33) und Valin (1,60) liegen weit außerhalb der normalen Streuung. Die Ursache dafür ist, daß zur tryptischen Spaltung ein Derivat des Gemisches von ß-Lactoglobulin A und ß-Lactoglobulin B eingesetzt wurde, die sich gerade in diesen Aminosäuren unterscheiden. O XVIIIb ist also ein Gemisch zweier analoger Peptide, von denen eines aus ß-Lactoglobulin A und eines aus ß-Lactoglobulin B stammt.

Wegen der besseren Übersichtlichkeit werden im folgenden nur die abgerundeten Zahlen (theoretische Aminosäurezusammensetzung) in die Tabellen eingesetzt.

[+] Das Auftreten eines weiteren Lysins in diesen Peptiden steht im Einklang mit der Partialformel (s. S. 72). Die Peptide beginnen nämlich beide mit der Sequenznummer 99 und enthalten zum Teil das Lysin aus Nummer 98, welches durch tryptische Spaltung hinter Arginin bei ihnen bleiben kann.

	O VIII	O IXa	O IXc	O XIIIa	O XVIIb	O XVIIIb	R Ib	R IIa	R IIb	R IIIb	R IIIc	R IVa	R VI	R VIIa	R VIIb	R X	R XIVb	R XIVd	R XVId	R XVIf	A Ia	A IIIc	A IXa	A XIb	A XIIa	A XVb	A XVc
Lys	1,11		1,17	1,18	1,05			1,09		1,07	1,02	1,14	1,28	1,08	2,10		1,06	1,45	2,04	2,54		1,02					
His							0,98									1,04							0,97				
Arg		0,98				0,87	1,16		1,05																		
Asp	0,95	1,99	3,00	1,98	2,00	0,97							1,01		1,95	1,01	1,06	1,10	2,94	2,99				1,03	1,05		1,05
Thr				1,07	0,59			2,16			0,98				1,05	1,01		1,04	0,87	1,13				0,96		1,00	
Ser		4,01				2,08										1,05								0,91	2,06		
Glu		1,03	1,06		2,97	5,08		1,08					1,02	1,05		3,35	3,13	5,02	3,14	6,01		1,00		3,98	3,11		1,96
Pro		1,00			0,99	1,33	0,99					0,74				0,98		2,07	0,90	2,08				1,08	1,34		
Gly					0,12								0,93				0,99	0,98	0,12	1,19						1,01	1,00
Ala		4,91	0,87		1,00	1,33	1,02			0,90		1,01		0,87			0,96		1,01	1,39		0,98			1,80	0,98	
Cys						2,94										0,79	0,87			1,01	+			1,01	0,99		1,00
Val				1,99	1,01	1,60		0,89	0,98			1,02			2,16			2,05	1,00	2,14						1,08	
Met		0,99				0,91	0,89	0,95																	0,86		
Ile		1,01	1,04				1,02	0,93				1,09	1,00	2,00		0,97		0,99		0,90			1,03				
Leu		3,99	1,04	2,03	1,03	4,06	1,20	1,01	0,98	1,03			1,01		1,95	1,99		3,86	1,03	4,19				2,07	0,98		
Tyr				0,80		0,78									0,78			0,91		0,89						0,81	
Phe	0,94					0,88						1,00				0,98			1,07					0,96			
Trp																	+			+						+	+
$\sum$ ~	3	20	8	9	11	23	7	8	3	3	2	6	6	5	9	14	9	19	14	27		3	2	12	12	6	5

Tab. 1: Analysenergebnisse aller gewonnenen tryptischen Peptide (nach saurer Hydrolyse). Die Werte für Thr, Ser und Cysteinsäure wurden mit empirischen Faktoren korrigiert. Tryptophannachweis: Mit Ehrlichs-Reagenz am unhydrolysierten Peptid.

	R + O = R			O + R = R			R - R = D			R = A + A			A + A = R		
	XVIIb + VIII = XVId			XIIIa + Ia = VIIb			XVIf - XIVd = D			XIVb = IIIc + XVc			XIb + IXa = X		
Lys	1 + 1 = 2			1 + 1 = 2			2 - 1 = 1			1	1				
His														1	1
Arg															
Asp	2 + 1 = 3			2		2	3 - 1 = 2			1		1	1		1
Thr	1		1	1		1	1	1					1		1
Ser													1		1
Glu	3		3				8 - 5 = 3			3 = 1 + 2			4		4
Pro	1		1				2	2					1		1
Gly							1	1		1		1			
Ala	1		1				1		1	1	1				
Cys							1		1	1		1	1		1
Val	1		1	2		2	2	2							
Met															
Ile							1	1						1	1
Leu	1		1	2		2	4	4					2		2
Tyr				1		1	1	1							
Phe		1	1										1		1
Trp							1		1	1		1			
	11 + 3 = 14			9 + 1 = 10			28 - 19 = 9			9 = 3 + 6			12 + 2 = 14		

Tab. 2: Zusammensetzung ditryptischer Peptide aus den tryptischen Teilpeptiden und Zusammensetzung cysteinhaltiger tryptischer Peptide aus den kleineren AEC-Peptiden, welche beim A-Lauf erhalten wurden.

	R Ia	R IIIc	R IIIb	O VIII	R VIIa	R IVa	R VI	A XVb	R Ib	R IIa	O IXc	R XIVb	O XIIIa	O XVIIb	R X	R XIVd	O IXa	O XVIIIb	Σ	β-L
Lys	n	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1		1			12	15
His									1						1				2	2
Arg									1								1	1	3	3
Asp				1			1				3	1/2	2	2	1	1	2	1	15/16	15/16
Thr		1						1		2			1	1	1	1			8	8
Ser															1		4	2	7	7
Glu					1		1			1	1	3		3	4	5	1	5	25	25
Pro						1			1					1	1	2	1	1	8	8
Gly							1	1				0/1				1			3/4	3/4
Ala			1		1	1		1	1		1	1		1			5	1/2	14/15	14/15
Cys												1			1			3	5	5
Val						1		1		1			2	1		2		1/2	9/10	9/10
Met									1	1							1	1	4	4
Ile					2	1	1		1	1	1				1	1	1		10	10
Leu			1				1		1	1	1		2	1	2	4	4	4	22	22
Tyr								1					1			1		1	4	4
Phe				1		1									1			1	4	4
Trp								1				1							2	2
Σ	3	2	3	3	5	6	6	6	7	8	8	9	9	11	14	19	20	23	162	162

Tab. 3: Übersichtstabelle über die tryptischen Peptide, welche sich zur Gesamtkette des ß-Lactoglobulins zusammensetzen lassen.

Analysenergebnisse auf ganze Molverhältnisse abgerundet.

Tabelle 2 zeigt Peptide, von welchen auch Teile gewonnen wurden, aus denen sie sich wieder zusammensetzen lassen. Das sind die ditryptischen Peptide und die cysteinhaltigen Peptide, die im A-Lauf weiter aufgespalten wurden. Es fällt auf, daß R XVIf, welches sicher R XIVd enthält, nach Subtraktion dieses R XIVd die Differenz D ergibt, die als Peptid nicht gefunden wurde. D unterscheidet sich von RXIVb nur durch den Austausch einer Asparaginsäure gegen ein Glycin, wie er auch zwischen den ß-Lactoglobulinen A und B vorliegt. Der unterschiedliche Gehalt an Asparaginsäure führte dazu, daß unter den hier verwendeten Bedingungen der tryptischen Spaltung praktisch kein D erhalten wurde.

In Tabelle 3 sind nun, nach Größe geordnet, die tryptischen Peptide aufgeführt, die zusammengenommen die Kette der Proteinuntereinheit bilden[+]. Die Peptide der beiden Austauschbereiche enthalten, in den entsprechenden Zeilen, beide Zahlen; durch einen Schrägstrich getrennt. Freies Lysin wurde in großer Menge gefunden,und aus der Tabelle ergibt sich, daß an drei Stellen der Kette (n = 3) eine Lys-Lys- oder Arg-Lys-Bindung vorkommen muß.

Auf Grund der Spezifität des Trypsins sollten alle Peptide ein Lysin oder ein Arginin enthalten, bis auf das C-terminale Peptid, das keine dieser Aminosäuren enthalten braucht. In Tabelle 3 finden sich aber zwei Peptide ohne eine dieser charakteristischen Aminosäuren, nämlich R X und A XVb. Da Isoleucin als C-terminale Aminosäure bekannt ist und nur R X Isoleucin enthält, muß es das C-terminale Peptid sein. A XV b enthält Tyrosin,und es ist zu vermuten, daß es durch die bereits erwähnte Nebenspezifität des Trypsins entstanden ist.

[+] Die zum Vergleich herangezogene Aminosäureanalyse der Gesamtuntereinheit stammt von Piez et al.[7]. Die Werte anderer Publikationen[6,8] unterscheiden sich von diesen nur in den Größen für Serin und Prolin um je eine Einheit. Da der prozentuale Fehler einer Aminosäureanalyse nicht von der Größe des hydrolysierten Moleküls abhängt, sind Peptidanalysen sicherer als Gesamtanalysen, so daß die Ergebnisse der Tabelle 3 als Bestätigung der von Piez veröffentlichten Analyse gewertet werden können.

Die hier beschriebenen Peptide R XIVb und D aus dem Asparaginsäure-Glycin-Austauschbereich stimmen nicht mit den entsprechenden tryptischen Peptiden überein, die Townend[12] veröffentlicht hat. (T_1 und T_2 in der nebenstehenden Tabelle). Auffällig ist besonders, daß Townend kein Cystein findet, während sich aus dem A-Lauf ergeben hat, daß R XIVb, durch Spaltung hinter AEC, in A IIIc und A XVc zerlegt werden kann. Dies, sowie die Tatsache, daß sich D und R XIVb zwanglos in Tabelle 3 einfügen lassen, macht es wahrscheinlich, daß die hier beschriebenen Peptide die richtigen tryptischen Peptide aus dem Austauschbereich sind.

	T_1	T_2	D	R XIVb
Lys	2	1	1	1
Asp	2	1	2	1
Glu	3	3	3	3
Gly	0	1	0	1
Ala	1	1	1	1
Cys	-	-	1	1
Val	1	1	-	-
Leu	1	1	-	-
Try	+	+	+	+

Die Gewinnung aller tryptischen Peptide, deren Summenformeln sich widerspruchslos zur Summenformel der Gesamtkette zusammensetzen lassen, ist der erste Schritt zur Sequenzanalyse. Mit dem zweiten Schritt soll die Reihenfolge dieser Peptide in der Kette gefunden werden, von der bisher nur bekannt ist, daß R X das letzte Peptid dieser Reihe sein muß.

III. Überlappungspeptide

a. Das Prinzip

Bei einer Anzahl von n Lys+Arg in der Gesamtkette wird diese durch tryptische Spaltung theoretisch in n+1 Teile zerlegt. Um diese Peptide ihrem richtigen Platz in der Kette zuzuordnen, benötigt man mindestens n+1 eindeutige, von einander unabhängige Informationen über die Zusammengehörigkeit zweier Peptide, oder die Position eines Peptids in der Kette (z.B. C- oder N-terminal).

Es liegt nahe, die notwendigen Informationen durch die Gewinnung ditryptischer Peptide zu beschaffen. Durch statistische Umsetzung der NH_2-Gruppen in Lys und Arg könnte man das Auftreten aller ditryptischen Peptide erzwingen. Dazu läßt sich berechnen, daß ein Maximum an ditryptischen Peptiden entsteht, wenn etwa 1/3 aller ursprünglich spaltbaren Stellen blockiert sind. Da gleichzeitig auch alle monotryptischen Peptide anfallen müssen, kommt man theoretisch mit einem einzigen Lauf, zur Gewinnung der tryptischen Peptide und Bestimmung ihrer Zuordnung, aus.

Leider läßt sich solche statistische Blockierung nicht ohne Weiteres praktisch verwirklichen. Besonders die gleichwertige Umsetzung von Lysin und Arginin dürfte Schwierigkeiten machen und müßte wohl nacheinander durchgeführt werden. Außerdem dürften sich erhebliche Trennungsprobleme ergeben, wenn mono-, di- und tri-tryptische Peptide (letztere wären auch noch in merklicher Menge vorhanden) nebeneinander vorlägen.

Üblicherweise werden die notwendigen Informationen durch neuerliche enzymatische Spaltung mit einem anderen Enzym als Trypsin gewonnen. Da zur Orientierung hergestellte "fingerprints" (Technik nach Ingram[19]) ergeben hatten, daß peptische Spaltung klarer voneinander abgesetzte Peptide hervorbringt, als die auch in Frage kommende chymotryptische Spaltung, wurde für das ß-Lactoglobulin Pepsin eingesetzt.

Die entstehenden Peptide werden isoliert und auf Lysin und Arginin untersucht, die hier nicht mehr am Ende stehen müssen. Lysin- oder Arginin-haltige peptische Peptide bilden nun vielmehr eine Überlappung zwischen zwei oder mehreren tryptischen Peptiden; zwischen welchen die Überlappung vorliegt, kann man freilich nicht erkennen, da sie von den tryptischen Peptiden normalerweise nur einen Teil enthalten. Hier ist weitere Information notwendig, die man durch tryptische Nachspaltung der peptischen Peptide gewinnen kann. Die Spaltprodukte können häufig eindeutig tryptischen Peptiden zugeordnet werden; dabei hat man gleichzeitig eine zusätzliche Information über die Richtung, da das Lysin oder Arginin nach der Nachspaltung C-terminal stehen muß. Ist aber dann eine eindeutige Zuordnung - der tryptischen Spaltstücke peptischer Peptide zu ganzen tryptischen Peptiden - noch nicht möglich, so muß durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz, sowohl bei den peptischen als auch bei den in Frage kommenden tryptischen Peptiden, eine Eindeutigkeit erreicht werden.

Diese Arbeit hängt stark von der Lage des jeweiligen Falles ab. Bei Peptiden mit 2 Lys (entspr. bei Lys + Arg) hat man den günstigsten Fall, daß gleichzeitig die Zusammengehörigkeit und die Richtung dieser Zusammengehörigkeit von drei tryptischen Peptiden durch eine tryptische Nachspaltung erhalten werden kann. Das sind 4 Informationen von denen allerdings eine aus den drei anderen herzuleiten ist. Enthalten peptische Peptide mehr als zwei tryptisch spaltbare Stellen, so entstehen bei der Nachspaltung zwei oder mehr ganze tryptische Peptide, über deren Reihenfolge dann noch keine Aussage gemacht werden kann.

b. Peptische Spaltung und Peptidgewinnung

Zur Zeit gibt es keine Regel, nach der man für eine bekannte Peptidkette vorhersagen könnte, ob und wo sie von Pepsin gespalten wird. Von einer Spezifität, im gleichen Sinne wie bei Trypsin, zu sprechen ist deshalb nicht möglich. Ein charakteristisches Merkmal des Pepsins ist es jedoch, daß es, bis auf sehr wenige Ausnahmen, nicht direkt neben Lysin oder Arginin spaltet[20]. Diese negative Spezifität macht das Enzym zur Gewinnung solcher Peptide geeignet, die eine Spaltstelle des Trypsins überbrücken sollen.

Wegen der im ß-Lactoglobulin vorhandenen Disulfidbrücken wurde, wie auch bei der tryptischen Spaltung, eine entsprechende Vorbehandlung des Proteins nötig. Da die peptische Spaltung im sauren Milieu stattfindet, bestand hier jedoch keine Gefahr einer Oxidation freier SH-Gruppen zu Disulfidbrücken, so daß es möglich war, daß ß-Lactoglobulin nach Reduktion ohne Alkylierung zur Spaltung einzusetzen.

Zur peptischen Spaltung wurden folgende Substanzen verwendet:

1.) mit Perameisensäure oxidiertes Protein.
2.) mit ß-Mercapto-äthanol in 8 m Harnstoff reduziertes Protein.

Beide Proben wurden nach beendeter Umsetzung erschöpfend gegen n/16 Salzsäure dialysiert und dann bei 37°C mit Pepsin 4,5 Stunden inkubiert.

c. Chromatographische Reinigung

Die Säulenchromatographien wurden unter den gleichen Bedingungen ausgeführt wie bei den tryptischen Peptiden. Die Läufe mit den peptischen Peptiden wurden jedoch zur Unterscheidung als PO- und PR-Lauf bezeichnet.

Obgleich die Dowex-1-Chromatographien als Parallelläufe mit direkt vergleichbaren Fraktionen durchgeführt worden waren, fanden sich, wie Abb. 6 zeigt, nur wenige Gipfel an gleicher Stelle. Die Übersichtschromatogramme Abb. 7 und 8 erklären diese Beobachtung: Obschon die enzymatischen Spaltungen beider Proben unter gleichen Bedingungen stattfanden, sind kaum gleiche Peptide entstanden.

Wie die Übersichtschromatogramme weiter zeigen, sind fast immer sehr viele peptische Peptide unter einem Gipfel des Dowex-1-Laufes vereint. Deswegen sehen die Dowex-1-Läufe von den peptischen Peptiden des ß-Lactoglobulins nicht wesentlich komplexer aus, als die von den tryptischen; obgleich bei peptischer Spaltung viel mehr Peptide entstanden sind.

Die Rechromatographien führten, wegen der vielen dabei zu trennenden Peptide nicht immer zu reinen Substanzen. Nicht einheitliche Gipfel der Rechromatographien mußten deswegen papierchromatographisch weiter gereinigt werden. Dafür wurde das Partridge-System (Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5) verwendet. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden zusätzlich zur bisher verwendeten Bezeichnung mit einer arabischen Zahl als Index versehen und zwar: bei dem Peptid mit dem kleinsten R_f-Wert beginnend, fortlaufend durchnummeriert.

Die Papierchromatographie eignet sich nur für geringe Substanzmengen und gibt schlechtere Ausbeuten als die Säulenchromatographie. Die über Papier nachgereinigten Peptide wurden deshalb nicht in Mengen gewonnen, wie sie für weitere Untersuchungen (z.B. Edman Abbau) notwendig wären.

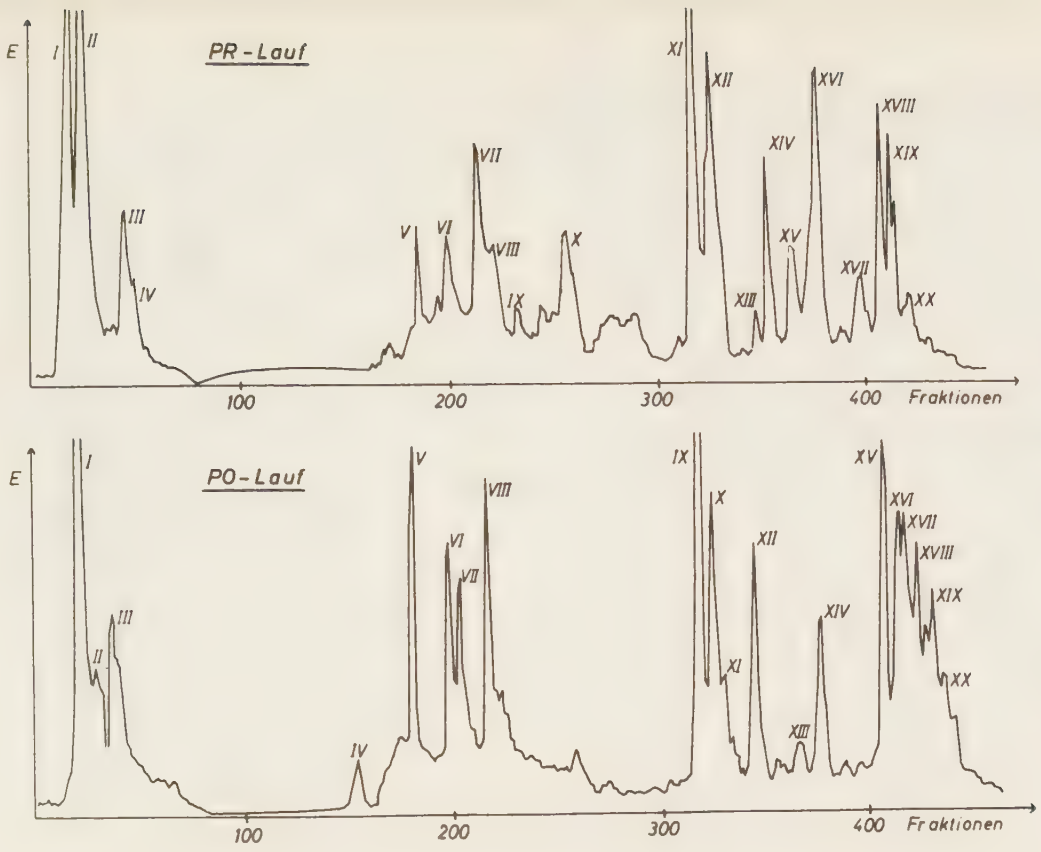
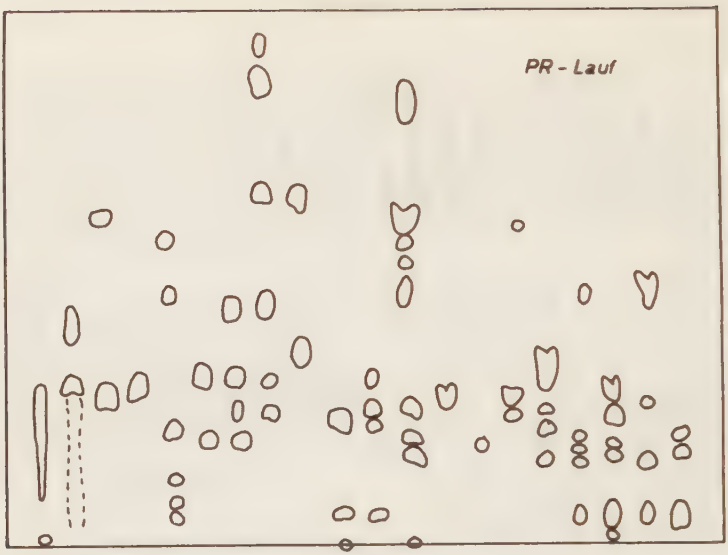


Abb. 6:

Dowex-1-Läufe der Peptischen Peptide des ß-Lactoglobulins. (PO- und PR-Lauf). Ausgezogene Linie: Ninhydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse.



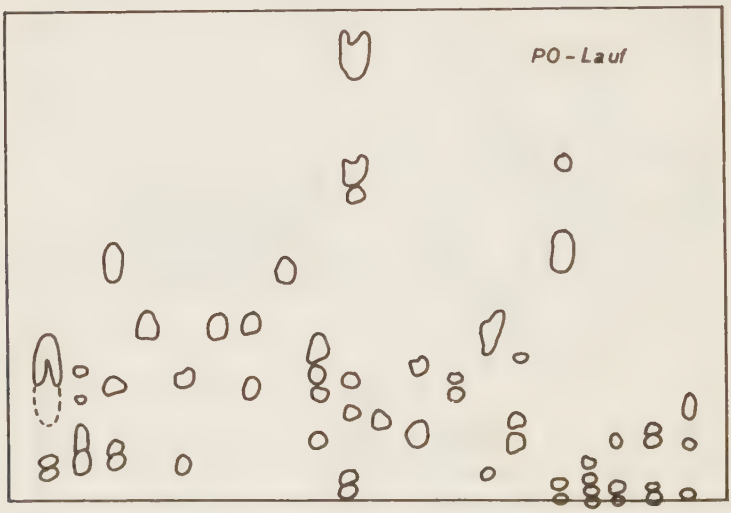


Abb. 7 und 8: Übersichtschromatogramme mit den Gipfelfraktionen der Dowex-1-Läufe von peptischen Peptiden (siehe Abb. 6).

Schwarz umrandet: Mit Ninhydrin-Sprühreagenz gefärbte Flecken.

Insgesamt wurden 54 peptische Peptide des ß-Lactoglobulins analysenrein erhalten. Neun von ihnen kamen in beiden Läufen vor, so daß es sich um 45 unterschiedliche Peptide handelt. Die Analysenergebnisse sind, auf Molverhältnisse umgerechnet, in den Tabellen 4 und 5 aufgezeichnet. Die abgerundeten Verhältniszahlen finden sich in den Tabellen 6 und 7, wobei Peptide aus dem Ala/Val-Austauschbereich durch zwei mittels Schrägstrich getrennte Zahlen zu erkennen sind. Wenn die Verhältniszahlen mehr als etwa $\pm$ 0,3 von ganzen Zahlen abweichen, dann ist das ein Hinweis auf terminal stehende, nur teilweise abgespaltene Aminosäuren. In diesen Fällen wurden auch in den Tabellen 6 und 7 Dezimalstellen geschrieben.

Die geringe Spezifität des Pepsins führt dazu, daß peptische Peptide sich gegenseitig überlappen und mehrere Spaltstücke freie Aminosäuren sind. Deswegen gelang es auch nicht, die Analyse der Gesamtkette als Summe der Analysen einer Anzahl peptischer Peptide zu erhalten. Das vorhandene Peptidmaterial reichte nun jedoch zur Aufstellung der Partialformel des ß-Lactoglobulins aus.

	PO Ia	PO Ib	PO Id	PO Ie	PO IIa	PO IId	PO IVa	PO Va	PO VIa	PO $VIIa_1$	PO VIIIb	PO IXf_1	PO IXg	PO IXh	PO Xd_1	PO XIa	PO XIIIb	PO XIVc	PO XVb	PO XVb	PO XVc	PO XVIb	PO XVIc	PO XVIIa	PO XVIIc	PO XVIIIa	PO $XVIIIb_1$	PO XIXa
Lys		2,13	3,97	4,03	5,08	3,15			1,03	0,95		1,04	1,10	1,07			0,98	1,06					1,85		1,03		2,22	
His			1,07	1,01		1,09													1,01		0,97							
Arg	0,91		0,95	0,98			1,00	0,96																		0,98	0,97	0,89
Asp			1,09	1,03		0,98	0,92	0,90	1,02	1,01	1,06	1,00	0,94	2,03		2,14	1,01	1,03		1,96			3,10	1,07	1,96	2,29	4,76	2,16
Thr		1,12			0,97				1,94	1,92	1,02	0,96	1,01				0,97	1,08	0,96	1,04			1,09			1,13	1,98	1,06
Ser	1,06						1,01	1,05			1,06					2,95							1,98	1,23		2,10	2,05	0,75
Glu	1,03		0,90	0,98	2,19	1,04	0,90	0,80	0,98		0,91	1,06	0,99	0,83	1,04	1,01	2,14	2,97	2,07		2,01	2,16	4,44	3,16	3,03	4,96	5,35	2,96
Pro	0,87	1,01	2,00	0,87	1,14	1,20	1,21	1,25			0,87	1,99	2,02				1,86	2,03					1,07	0,82		1,84	1,85	1,03
Gly									0,89	1,10		1,14	0,98				1,01	0,99										
Ala	1,19	1,02	2,96	2,13	2,85	2,04	1,87	1,86						0,84	0,92	2,82							1,15	0,95		1,65	1,78	0,50
Cys																			1,03		1,03		1,06			2,73	2,92	1,99
Val	0,98	0,92			1,01		1,02	1,00	0,75	0,85								1,02				1,00				1,46	2,27	2,41
Met			0,95	0,87		0,92			0,86	0,93													0,98			0,87	1,08	
Ile		0,92	0,95	1,04	3,14	0,99			0,71	0,72				1,01		0,87			0,93		0,98							
Leu	1,04		4,93	2,93		2,96	2,12	1,16	1,82	1,01	0,94	0,86	2,06	0,98	1,04	1,18	1,79	1,89					2,11	1,01	0,97	1,96	4,05	1,92
Tyr																		0,87				0,93	1,87				1,96	
Phe		0,75	1,10	1,05	0,97	0,89					0,79												0,98				1,03	
Trp																												

Tab. 4: Analysenergebnisse aller aus dem PO-Lauf gewonnenen Peptide (nach saurer Hydrolyse). Die Werte für Thr, Ser und Cysteinsäure wurden mit empirischen Faktoren korrigiert.

	PR Ia	PR Ib	PR Ic	PR II f	PR II g	PR II k	PR III c	PR V b	PR VI b	PR VIII a	PR VIII a	PR X c	PR XI d	PR XI e	PR XII d	PR XII d	PR XIII b	PR XIV b	PR XV a	PR XV c	PR XVI c	PR XVII b	PR XVIII d	PR XVIII f	PR XIX b	PR XIX c
Lys	5,01	4,98	3,23	2,12	3,24	3,85	0,93		1,06			1,98	1,01				0,94		0,90		0,97	0,93		1,11		
His			1,11			1,08								1,01												
Arg			1,06			1,06		0,91												0,95			0,94			1,05
Asp			1,00		0,83	0,96		0,93	1,03			2,00	2,07		1,03	1,04	1,01	0,84	0,98	1,31	0,80	1,05	2,03	2,10		1,93
Thr	0,92	0,93		1,00			1,04		1,94			1,08		0,87			1,05		1,04	1,14	0,95	1,07	1,02			0,99
Ser								1,06		1,04	0,96				0,97			2,08								
Glu	2,05	2,07	1,14		0,97	1,09	1,05	1,08	0,91				1,17	2,16			2,02	3,14	2,97		2,83	3,98	1,96	3,24	2,02	1,99
Pro	1,09	1,22	0,95	1,11		1,04		0,95									1,85	1,01	1,86	0,70	1,82	1,93	0,96			1,10
Gly							1,01		1,12								1,04		1,02		0,96	1,08				
Ala	2,74	2,83	2,75	1,05	3,18	2,23	1,02	2,01					1,01		1,83	0,76		0,96					1,01			
Cys														0,94												
Val	0,97	0,96		0,92			1,01	1,02	0,87										0,99	2,05	1,05	1,07	2,11		0,93	1,93
Met			0,92			0,80			0,33																	
Ile	2,82	2,79	1,10	0,97		0,83	0,94		0,76	0,94	0,94		1,04	1,02												
Leu		1,07	3,71		1,87	3,07		1,04	1,05	1,01	2,10	2,06	1,01			1,20	1,87	0,97	1,84	1,02	1,89	1,93		1,18		
Tyr												1,96									0,80	0,95			1,05	
Phe	0,96	1,02	1,01	0,84	0,88	1,03																				
Trp							+																	+		

Tab. 5: Analysenergebnisse aller aus dem PR-Lauf gewonnenen Peptide (nach saurer Hydrolyse). Die Werte für Thr, Ser und Cysteinsäure wurden mit empirischen Faktoren korrigiert. Tryptophannachweis mit Ehrlichs-Reagenz am unhydrolysierten Peptid.

	PO Ia	PO Ib	PO Id	PO Ie	PO IIa	PO IId	PO IVa	PO Va	PO VIa	PO VIIa$_1$	PO VIIIb	PO IXf$_1$	PO IXg	PO IXh	PO Xd$_1$	PO XIa	PO XIIIb	PO XIVc	PO XVa	PO XVb	PO XVc	PO XVIb	PO XVIc	PO XVIIa	PO XVIIc	PO XVIIIa	PO XVIIIb	PO XIXa
Lys		2	4	4	5	3			1	1		1	1	1			1	1					2		1		2	
His			1	1		1													1		1							
Arg	1		1	1			1	1																		1	1	1
Asp			1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	2		2	1	1		2			3	1	2	2	5	2
Thr		1			1				2	2	1	1	1				1	1	1	1			1			1	2	1
Ser	1						1	1			1					3							2	1		2	2	0,6
Glu	1		1	1	2	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	2	3	2		2	2	4,5	3	3	5	5	3
Pro	1	1	2	1	1	1	1	1			1	2	2				2	2					1	1		2	2	1
Gly									1	1		1	1				1	1										
Ala	2	1	3	2	3	2	2	2						1	1	3							1	1		1/2	1/2	0/1
Cys																			1		1		1			3	3	2
Val	1	1			1		1	1	1	1								1				1				2/1	3/2	3/2
Met			1	1		1			1	1													1			1	1	
Ile		1	1	1	3	1			1	1				1		1			1		1							
Leu	1		5	3		3	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2					2	1	1	2	4	2
Tyr																		1				1	2				2	
Phe		1	1	1	1	1					1												1				1	
Trp																												
$\sum$	8	8	21	17	17	15	10	9	11	9	7	8	9	7	3	11	10	13	6	3	5	4	21	8	7	22	34	15

Tab. 6: Zusammensetzung aller Peptide aus dem PO-Lauf.
Molverhältnisse von Tabelle 4 abgerundet.

	PR Ia	PR Ib	PR Ic	PR IIf	PR IIg	PR IIk	PR IIIc	PR Vb	PR VIb$_2$	PR VIIIa$_2$	PR VIIIa$_3$	PR Xc	PR XId	PR XIe	PR XIId$_1$	PR XIId$_3$	PR XIIIb	PR XIVb	PR XVa	PR XVc	PR XVIc	PR XVIIIb	PR XVIIIc	PR XVIIIf	PR XIXb	PR XIXc
Lys	5	5	3	2	3	4	1		1			2	1				1		1		1	1		1		
His			1			1								1												
Arg			1			1		1												1			1			1
Asp			1		1	1		1	1			2	2		1	1	1	1	1	1	1	1	2	2		2
Thr	1	1		1			1		2			1		1			1		1	1	1	1	1			1
Ser								1		1	1				1			2								
Glu	2	2	1		1	1	1	1	1				1	2			2	3	3		3	4	2	3	2	2
Pro	1	1	1	1		1		1									2	1	2	1	2	2	1			1
Gly							1		1								1		1		1	1				
Ala	3	3	3	1	3	2	1	2					1		2	1		1					1			
Cys														1												
Val	1	1		1			1	1	1										1	2	1	1	2		1	2
Met			1			1			0,3																	
Ile	3	3	1	1		1	1		1	1	1		1	1												
Leu		1	4		2	3		1	1	1	2	2	1			1	2	1	2	1	1	2		1		
Tyr												2									1	1			1	
Phe	1	1	1	1	1	1																				
Trp							1																	1		
$\sum$	17	18	18	8	11	17	8	9	9	3	4	9	7	6	4	3	10	9	12	7	12	14	10	8	4	9

Tab. 7: Zusammensetzung aller Peptide aus dem PR-Lauf.
Molverhältnisse von Tabelle 5 abgerundet.

IV. Die Partialformel

Die Partialformel des ß-Lactoglobulins ist auf einer ausklappbaren Tafel auf Seite 72 dargestellt. Darunter sind die wichtigsten Peptide eingezeichnet, deren Analyse zu ihrer Aufstellung führten.

In der Partialformel hat jedes der gewonnenen Peptide seinen festen Platz. Es wurde kein Peptid gefunden, das nicht in die Formel paßt. Die Zuordnung aller Peptide ist also eindeutig und widerspruchslos.

Die obigen Aussagen bedürfen allerdings ausführlicher Beweise, welche der Gegenstand dieses Kapitels sind.

a. Einführung in die Zeichensprache

Alle Sequenzen werden, entsprechend der Proteinbiosynthese, vom N- zum C-Terminus geschrieben. Damit ergibt sich eindeutig, daß eine ganz links stehende Aminosäure eine freie NH_2-Gruppe, eine ganz rechts stehende Aminosäure eine freie COOH-Gruppe besitzt. Diese Gruppen werden nicht zusätzlich in die Sequenzformel aufgenommen.

Entsprechend der Gesamtlänge der Kette des ß-Lactoglobulins von 162 Aminosäuren gibt es 162 Positionen, die fortlaufend numeriert werden. Ist von einer Gruppe von n Aminosäuren bekannt, daß sie die Positionen von a bis b einnimmt, die Reihenfolge der n einzelnen Aminosäuren in diesem Bereich aber noch nicht festgestellt, so wird die Gruppe in den entsprechenden Sequenzbereich geschrieben und in runde Klammern gesetzt.

Eine waagerechte Linie mit zwei Pfeilspitzen unter einem Sequenzbereich von a bis b bedeutet ein gewonnenes Peptid von dieser Größe und Zusammensetzung. Die systematische Bezeichnung für das Peptid befindet sich direkt unter dieser Linie. Sind mehrere Peptide gefunden, die diesen Sequenzbereich, oder Teile davon, betreffen, so finden sich mehrere Waagerechten untereinander und deuten damit Überlappungen an.

In diesem Falle ist die obere Zeile den tryptischen Peptiden vorbehalten und wird als Zeile O gekennzeichnet. Die folgenden Zeilen werden durchnumeriert, um Hinweise auf besondere Peptide zu erleichtern.

Wurde an peptischen Peptiden eine tryptische Nachspaltung vorgenommen, so werden die Spaltstellen durch kurze senkrechte Pfeile angedeutet, welche die Waagerechte von unten nach oben durchbrechen ( ).

Sind an Peptiden Endgruppen bestimmt worden, so werden die entsprechenden Positionen durch kleine waagerechte Pfeile angedeutet, die unmittelbar unter der zugehörigen Peptidlinie liegen und mit ihrer Spitze in die Richtung zeigen, in welcher das Peptid abgebaut wurde. Bei Edman-Abbau mehrerer Aminosäuren nacheinander oder bei einem Abbau mit Exopeptidasen findet sich für jede Aminosäure ein eigener Pfeil, so daß sich die Anzahl der Abbauschritte sofort ablesen läßt.

b. Begründung der Partialformel

In der Praxis verläuft die Aufstellung der Partialformel meist derart, daß man bei einigen Peptiden Überlappungen direkt erkennt, bei anderen erst nach tryptischer Nachspaltung. Im Laufe der Arbeit ergeben sich dann zunächst einzelne Bereiche mehrerer tryptischer Peptide, die sich schließlich zur Gesamtkette zusammenfügen lassen. Nachdem die fertige Formel bereits vorliegt, ist es hier jedoch möglich, systematisch vom N- zum C-Terminus vorzugehen.

Das N-terminale Peptid ist R IIa. Dies erscheint zunächst unmöglich, wenn man von der N-terminalen Sequenz Leu-Leu-Val ausgeht, die Fraenkel-Conrat[9] veröffentlicht hat, denn R IIa enthält nur ein Leucin. Eine Wiederholung des Edman-Abbaus auf Papier, nach der Methode von Shelton und Schroeder[21], ergab jedoch für ß-Lactoglobulin die Sequenz Leu-Ile-Val, wie sie unter gleichen Bedingungen auch bei R IIa gefunden wurde.

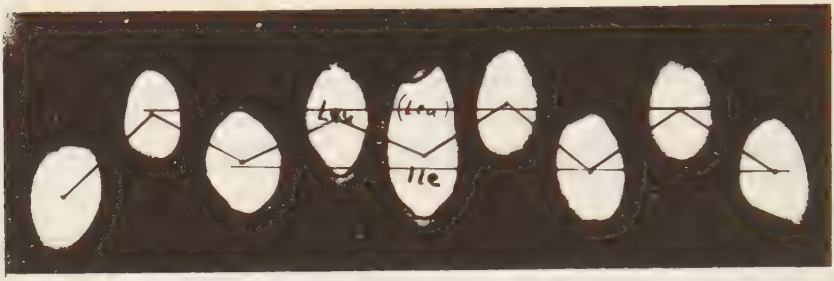


Abb. 9: Leu/Ile-Unterscheidung der ersten zwei Edman-Schritte vom Peptid R IIa.

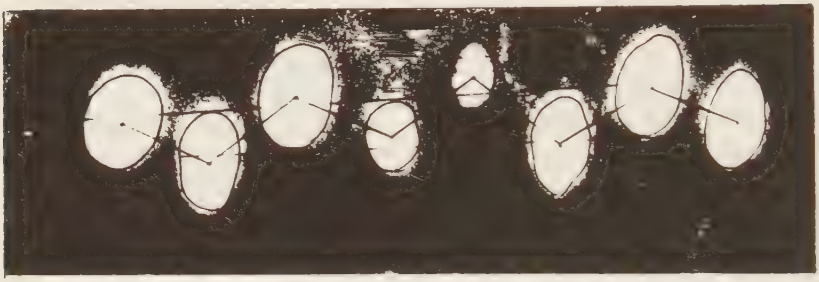


Abb. 10: Leu/Ile-Unterscheidung der ersten zwei Edman-Schritte von ß-Lactoglobulin.

Versuchsbedingungen zu den Abbildungen 9 und 10:

Papier: Whatman No. 1 das mit 5 %-iger Stärkelösung imprägniert und luftgetrocknet war. Es wurde vor dem Auftragen der Proben durch Formamid/Aceton = 2:7 gezogen.

System: n-Heptan/Benzol = 2:3 absteigend.

Endwicklung: Mit Jod-Azid-Reagenz nach Trocknung bei 100°. Das Papier wird nur dort nicht gefärbt, wo Substanz vorhanden ist.

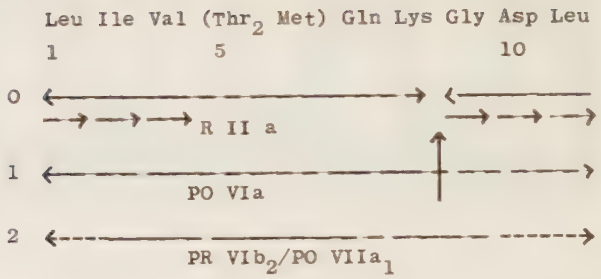
Die Abbildungen zeigen nur 5 cm des insgesamt etwa 50 cm langen Papieres. Laufstrecke der PTH-Aminosäuren: etwa 45 cm.

Die papierchromatographische Trennung der aus Leucin und Isoleucin hervorgegangenen Phenylthiohydantoine (Abgek.: PTH-Leucin und PTH-Isoleucin) erfolgte in einem chromatographischen System das speziell für diesen Zweck entwickelt worden ist[21]. Darin hat PTH-Leucin einen etwas höheren R_f-Wert als PTH-Isoleucin, was durch alternierende Auftragung von PTH-Leucin und PTH-Isoleucin als Referenzsubstanzen besonders deutlich hervortritt. Abb. 9 und 10 zeigen die Ergebnisse dieser Leu/Ile-Unterscheidungen an den Produkten der ersten beiden Edman-Abbau-Schritte vom ß-Lactoglobulin und dem Peptid R IIa.

	R IIa	ß-Lactoglob.
Asp		0,175 µmole
Thr	0,269 µmole	0,536 µmole
Gln		0,242 µmole
Gly		0,200 µmole
Ala		0,421 µmole
Val	0,108 µmole	0,245 µmole
Met	0,094 µmole	0,218 µmole
Ile	0,106 µmole	0,303 µmole
Leu	0,119 µmole	0,458 µmole
Tyr		0,108 µmole

Tab. 8: Durch Aminopeptidase M von R IIa und ß-Lactoglobulin abgespaltene Aminosäuren.

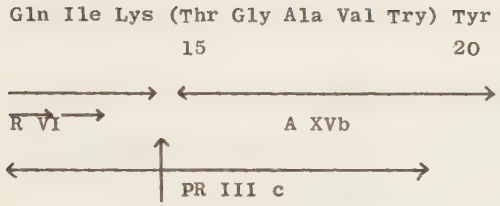
Die Richtigkeit dieser Ergebnisse konnte durch einen partiellen enzymatischen Abbau mit Aminopeptidase M bestätigt werden, der im Parallelversuch an R IIa und ß-Lactoglobulin durchgeführt wurde und die in der nebenstehenden Tabelle 8 aufgezeichneten Ergebnisse brachte.



Die Aminopeptidase spaltet am Gesamtprotein weit mehr Aminosäuren ab, als eigentlich zu erwarten wäre, dennoch ist eine Parallelität zur Reaktion am Peptid unverkennbar. Besonders die Tatsache, daß gleichzeitig Met und offenbar 2 Thr auftreten, spricht bereits eindeutig für R IIa, da kein anderes tryptisches Peptid diese Kombination enthält. Nicht einmal Met mit einem Thr tritt irgendwo auf. Zusätzlich ist das Gln ein Beweis, denn weil R IIa ein basisches Peptid ist, kann es kein Glu enthalten.

Durch die Peptide PO VIa und PO VIb_2 wird nun die Überlappung zu R VI gegeben. Bei der tryptischen Nachspaltung von PO VIa tritt neben dem Teil von R VI das ganze tryptische Peptid R IIa auf, obgleich PO IVa nur ein Lys enthält. Das bedeutet, daß entweder Pepsin gleich hinter Lys gespalten haben muß oder daß es sich bei R IIa um das N-terminale tryptische Peptid handelt. Da peptische Spaltungen hinter Lys nur beobachtet wurden, wenn eine aromatische Aminosäure auf das Lys folgte, spricht auch dieses Ergebnis für die endständige Position von R IIa.

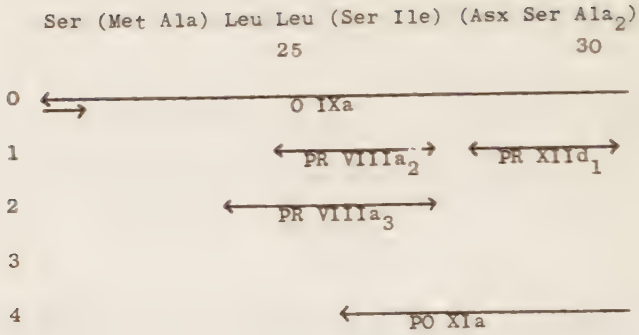
Von R VI wurde mit Aminopeptidase die Sequenz ermittelt. Da dieses Peptid ein Neutralpeptid ist, war vor dem Aminopeptidase-Versuch bereits klar, daß entweder ein Asn oder Gln vorhanden sein müßte. Das Gln wurde hier gefunden.



Aus der Sequenz von R VI ergibt sich für PR VIb_2, welches ein Leu weniger enthält als PO IVa, daß man nicht sagen kann, an welcher Seite das Leu abgespalten worden ist. Die Frage ließe sich zwar durch einen Edman-Abbau leicht beantworten, doch würde sich dabei für die Sequenz nichts Neues ergeben können.

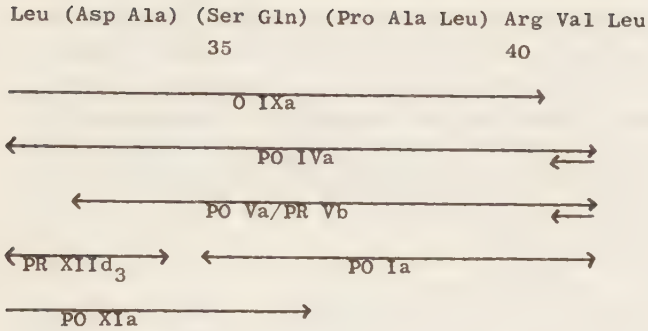
Auf R VI folgt in der Kette das Lys-freie A XVb. Die Überlappung konnte durch Nachspaltung von R IIIc bewiesen werden. Wegen Gln in Position 12 muß R IIIc auch basisch sein. Leider endet dieses Peptid mit der Position 19, d. h. das Pepsin hat hier vor Tyr gespalten, was allerdings nicht ungewöhnlich ist. Leider trat als nächste Spaltstelle gleich die Bindung von 20 nach 21 auf, so daß freies Tyr entstand und kein Überlappungspeptid gefunden werden konnte. Das freie Tyr wurde aus den Chromatographien auch nicht gewonnen, vermutlich weil es gegenüber den Peptiden sehr schwach anfärbt. (Ein Peptid mit a Aminosäuren gibt nach alkalischer Hydrolyse etwa a mal soviel Farbstoff, wie eine einzelne Aminosäure).

Wegen des Fehlens eines Überlappungspeptides zwischen A XVb und O IXa konnte diese Zusammengehörigkeit erst zum Schluß der Zuordnungsarbeit erkannt werden, nachdem genügend andere Informationen vorhanden waren. O IX a hat Ser als N-terminale Aminosäure und damit erklärt sich vielleicht die Labilität der Bindung zwischen 20 und 21. Das Peptid ist, als Teil des "eigentlichen" tryptischen Peptids A XVb + O IXa, mit 21 Aminosäuren immer noch recht groß, und Pepsin findet hier viele



Angriffsstellen. PO XIa aus Zeile 4 ist das größte Peptid aus diesem Bereich und fällt deswegen auch nur in geringer Menge an (s. Abb. 6). Es ist wegen der 3 darin enthaltenen Ser eindeutig dem O IXa zuzuordnen. Die übrigen Spaltprodukte wurden offenbar nicht alle isoliert, wie man aus dem Fehlen von Zwischenstücken zwischen den abgebildeten Peptiden deutlich erkennen kann, doch fanden sich die Tri- und Tetrapeptide aus den Zeilen 1-3 in recht guter Ausbeute. Sie konnten erst am Ende der Zuordnungsarbeit an diesen Stellen eingeordnet werden, als sich ergeben hatte, daß kein anderer Platz in der Kette für sie möglich war.

PO IVa, PO Va und PO Ia konnten als Arg-haltige Peptide nur an einer der drei Arg-Positionen stehen und ihre Zugehörigkeit zu O IXa wurde bald angenommen. O IX a enthält jedoch kein Val, wie diese Peptide, so daß das Val rechts vom Arg stehen mußte. Dennoch konnte mit Trypsin keine Nachspaltung erreicht werden, sondern alle Versuche gaben unverändertes Ausgangsmaterial, als ob das Arg bereits C-terminal stünde. Die Erklärung für dieses Verhalten findet sich darin, daß die Peptide mit der Sequenz Arg-Val enden. Dadurch tritt in unmittelbarer Nähe des Arg eine negative Ladung auf, die die tryptische Spaltung offenbar genau so erschwert, wie es ein Asp in der Kette bekanntlich auch zu tun vermag, wenn es



direkt neben Lys oder Arg steht. Sowohl durch Hydrazinolyse, als auch mit Carboxypeptidase konnte Val als C-terminale Aminosäure der Peptide PO IVa und PO Va bestimmt werden. Daß Carboxypeptidase in diesem Falle nur Val freisetzt, spricht ebenfalls für die Arg-Val-Sequenz, da Carboxypeptidase A kein Arg abzuspalten vermag.

Nun ergibt sich leicht, daß in Position 33/34 ein Asp und in Position 35/36 ein Gln stehen muß, denn PO IVa und PO Va sind Neutralpeptide, PO Ia ist basisch und PR $XIId_3$ ist sauer.

Eine Überlappung von O IXa zum nächsten Peptid ist schwer zu finden, weil jedes Val-haltige tryptische Peptid in Frage kommt, solange man keine Sequenzen kennt. Mit dieser Zuordnung wurde folglich gewartet bis O XIIIa als einziges Val-haltiges Peptid noch nicht vergeben war. Dann wurden von O XIIIa zwei Edman-Abbau-Schritte durchgeführt, die Val-Leu ergaben. Obgleich diese Überlappung nur aus einer Aminosäure besteht, ist sie damit doch doppelt gesichert.

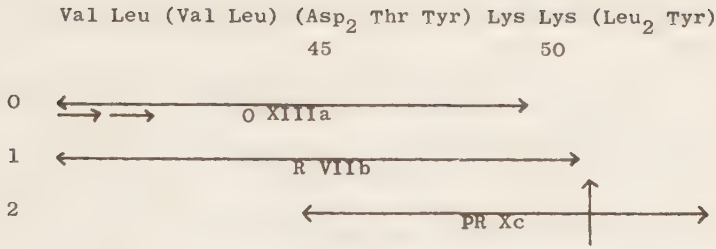
Die nächste Überlappung, nach O $XVIIIb_1$, ist durch zwei Peptide gegeben. Zunächst durch PR Xc, welches nach der Aminosäureanalyse anfangs für nur halb so groß angesehen wurde, wie es wirklich ist, weil es jede Aminosäure, bis auf Thr, doppelt enthält. Ein zu kleiner Wert für Thr ist aber durch-

aus nicht ungewöhnlich, zumal wenn man annimmt, daß es womöglich terminal steht. Durch die tryptische Nachspaltung wurden jedoch zwei Tyr-Peptide erhalten, und daraus ergab sich die doppelte Größe von PR Xc. Diese Nachspaltung soll hier als Beispiel für alle anderen aufgezeigt werden, die in der Regel außerordentlich glatt oder gar nicht (siehe PO IVa und PO Va) gingen.

		PR Xc		
Lys	(0,99)	1,98		1,92
Asp	(1,00)	2,00		2,08
Thr	(0,54)	1,08		1,00
Leu	(1,03)	2,06	2,01	
Tyr	(0,89)	1,78	0,99	1,00

Bei PR Xc tritt nach der Nachspaltung ein Peptid mit 2 Lys und eins ganz ohne Lys auf. Das ist ein Zeichen für eine Lys-Lys-Bindung, die offenbar um so schlechter aufgeht, je kürzer die Kette ist, in der sie sich befindet. Bei den tryptischen Peptiden wurde diese Lys-Lys-Bindung auch bereits gefunden, da das ditryptische Peptid R VIIb auftrat, das aus O XIIIa und freiem Lys zusammengesetzt werden konnte. Es war zunächst jedoch nicht klar, ob das zweite Lys am Anfang oder am Ende von O XIIIa zu stehen hätte. Durch die Kombination mit Asp_2, Thr, Tyr, die in keinem anderen tryptischen Peptid als O XIIIa vorkommt, ergibt sich nun eindeutig die Stellung der Lys-Lys-Bindung in Position 49-50.

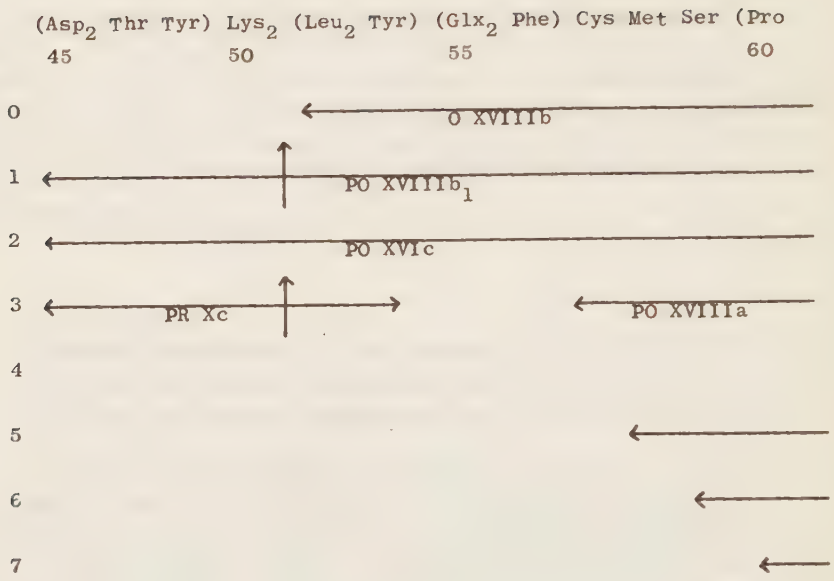
Aus einem Vergleich der sauren Peptide O XIIIa/R XIIa mit dem neutralen R VIIb ergibt sich, daß in diesem Bereich zwei Asp vorliegen müssen, denn schon ein Asn würde bedeuten, daß O XIIIa neutral und R VIIb basisch wäre.



Daß PR Xc als Neutralpeptid so spät von Dowex 1 eluiert wird, läßt sich durch Absorption der beiden Tyr an die aromatische Matrix des Austauschers leicht erklären.

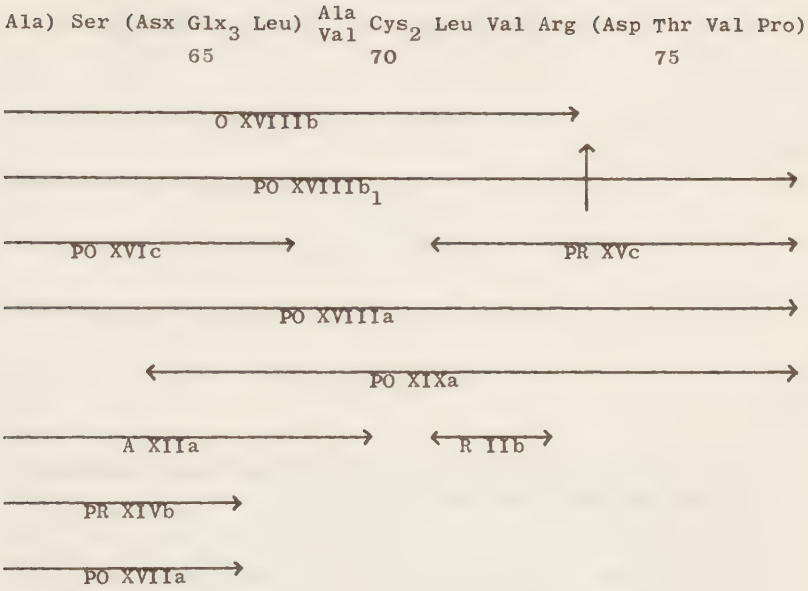
Für das auf O XIIIa folgende tryptische Peptid bestehen nur noch zwei Möglichkeiten: nämlich die beiden übrigen tryptischen Tyr-Peptide. R XIVd fiel hier aus, da das Try bei ihm ziemlich in der Mitte zu stehen schien, so daß nur noch O XVIIIb in Frage kam. Durch die Zusammensetzung von PO XVIIIb$_1$, einem peptischen Peptid mit 33 Aminosäuren[+], scheint diese Überlappung bereits ohne tryptische Nachspaltung eindeutig, denn die 3 Cys und der Ala/Val-Austausch weisen klar auf O XVIIIb hin, die 2 Tyr deuten auf die Überlappung nach O XIIIa, da O XVIIIb nur ein Tyr enthält. Erwartungsgemäß liefert die tryptische Nachspaltung das ganze O XVIIIb sowie das Asp$_2$, Thr, Tyr von O XIIIa und Asx, Thr, Pro, Val, als Anschluß an das Arg in Position 73.

[+] Das Auftreten eines so großen Peptischen Peptides ist ungewöhnlich, zumal Tyr und Phe als mögliche Spaltstellen darin enthalten sind. Ein Vergleich der beiden peptischen Läufe zeigt, daß die Spaltungen offenbar völlig unterschiedlich verlaufen sind. PR Xc und PR XVc, zwei Hauptprodukte des PR-Laufes, finden sich im PO-Lauf überhaupt nicht, wie man aus Abb. 1 deutlich erkennen kann.



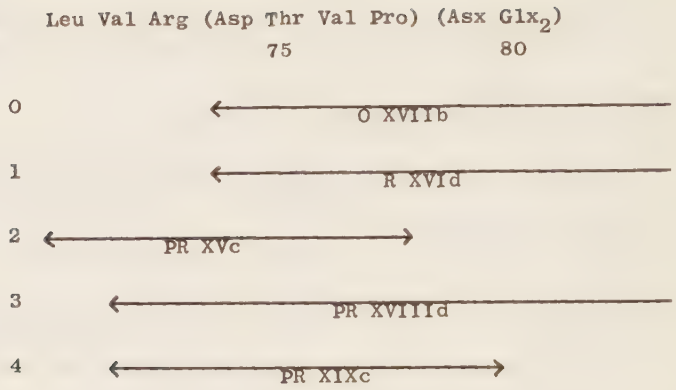
Das Asx, Thr, Pro, Val findet sich auch in PR XVc, und ein weiterer großer Teil des PO XVIIIb$_1$ ist das PO XVIc. Dazwischen fehlen (in Zeile 2) drei Aminosäuren, das Ala/Val von der Austauschposition und 2 Cys. Daß diese in der Sequenz Ala/Val-Cys-Cys stehen, folgt aus A XIIa (Zeile 5). Dieses beginnt als tryptisches AEC-Peptid hinter einem Lys oder AEC und hat selbst ein AEC am Ende stehen. Damit ist in diesem Falle ein Cys in Position 57 und eines in Position 69 gegeben, das dritte Cys aus O XVIIIb muß folglich in Position 70 stehen. Diese Cys-Cys Sequenz hatte sich durch das Auftreten von freiem AEC im A-Lauf bereits angekündigt, doch war da auch noch eine Lys-Cys-Sequenz möglich gewesen.

PO XVIIIa überdeckt noch einmal den ganzen Bereich von Position 57 bis 77 und geht auf einer Seite noch um 2 Glx darüber hinaus. Beide Seiten kommen dafür in Frage, welche zu-



trifft wurde nicht ermittelt. PO XIXa aus Zeile 4 hat nur 0,6 Ser, vermutlich aus Position 62 und beginnt dann sicher mit Position 63. Es sichert noch einmal zusätzlich die 2 Cys in diesem engeren Bereich, die sich sonst nur aus Differenzen ergeben würden.

Die Peptide A XIIa, PR XIVb und PO XVIIa sind bezüglich ihres Endpunktes genau festgelegt: A XIIa durch die Spezifität des Trypsins, die beiden anderen weil sie den Ala/Val-Austausch nicht mehr enthalten, wohl aber noch das Asx, Glx_3, Leu von PO XIXa. Da sie unterschiedliche Anfangspositionen haben, geben sie die Sequenz Cys-Met-Ser von 57 bis 59. Obgleich PR XIVb und PO XVIIa sich nur durch ein Ser voneinander unterscheiden, treten sie doch in den Parallelläufen an zwei ganz verschiedenen Stellen auf. Das kann man nur dadurch erklären, daß bei PO XVIIa Amidgruppen von Asn oder Gln verloren gegangen sind. Für die Bestimmung dieser Aminosäuren darf also nur A XIIa oder PR XIVb verwendet werden.



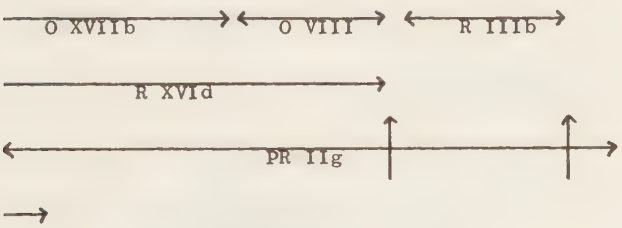
R IIb (Seite 43, Zeile 5) trat als Nebenprodukt im R-Lauf auf. Es kann nur an diese Stelle gehören, weil es Arg am Ende haben muß.

PR XVc muß Asp enthalten, da es ein neutrales Peptid ist. Über die anderen Asx und Glx bei Position 55 und 65 läßt sich nicht aussagen, weil die betreffenden Peptide immer mehrere davon enthalten.

Asp, Thr, Pro und Val rechts von Arg bedeutet Überlappung nach O XVIIb oder R XIVd. Bei R XIVd muß jedoch das Pro nahe am Lys stehen, wie sich durch PO IXf (Seite 49, Zeile 6) zeigen läßt. Es bleibt also nur O XVIIb übrig. R XVId, ein ditryptisches Peptid aus O XVIIb und O VIII, gibt sofort die nächste Überlappung, eben nach O VIII.

Die Peptide PR XVIIId und PR XIXc enthalten Arg und 2 Val, jedoch kein Leu und können damit nur in den Bereich dieses Arg aus Position 73 gehören. Sie müssen mit dem Val von 72 beginnen, da O XVIIb nur ein Val enthält. Damit ist die Sequenz Leu-Val-Arg gegeben. Weil PR XVIIId ein Ala mehr enthält als PR XIXc, muß in Position 81 ein Ala stehen.

Ala (Leu Gln) Lys Asp Phe Lys (Ala Leu) Lys Ala
85 90

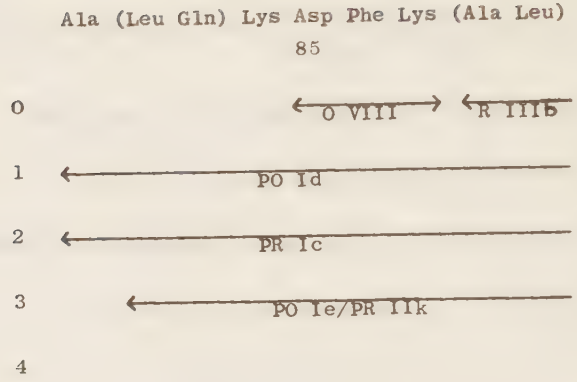


PR IIg aus Zeile 2 gibt die nächste Überlappung nach R IIIb, die jedoch erst durch tryptische Nachspaltung klar wird. Die Lys-Asp-Bindung von 84 nach 85 wurde im Peptid praktisch gar nicht tryptisch gespalten, das ist ein weiterer Beweis für die Zugehörigkeit von PR IIg zu R XIVd, bei dem diese Bindung ja auch erhalten geblieben ist.

Weil O VIII ein Neutralpeptid ist, muß es Asp enthalten. Die Sequenz Asp-Phe-Lys wurde nur auf Grund der Tatsache angenommen, daß Lys-Asp-Bindungen tryptisch immer schlechter gespalten werden als andere Lys-Sequenzen und daß dies die naheliegendste Erklärung für die beobachtete schlechte Spaltbarkeit ist.

PR IIg ist, obgleich es das Asp aus Position 85 enthält, ein basisches Peptid. Das ist nur möglich, wenn keine weitere saure Aminosäure darin vorkommt und damit muß in Position 82 oder 83 ein Gln stehen.

Das freie Ala aus Position 91, konnte bei der Chromatographie der Spaltprodukte von PR IIg isoliert werden, was bei freien Aminosäuren durchaus nicht immer gelingt.

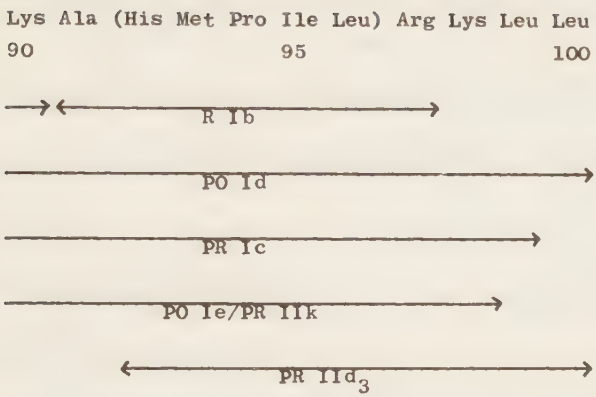


Auf R IIIb folgt in der Kette R Ib. Die Überlappung wird durch sehr große Peptide gegeben, die das ganze PR IIg enthalten, nach rechts aber darüber hinaus gehen. Es sind PO Id und PR Ic, die sich nur durch ein Leu voneinander unterscheiden. Noch ein Leu weniger und auch nicht das Ala in Position 81 hat das PO Ie. Es schließt damit an PR XVIIId an, während PO Id und PR Ic an PR XIXc anschließen.

Die Zugehörigkeit von R Ib zu diesen langen Peptiden ist durch die Kombination von Arg mit His unübersehbar, besonders, wenn es bereits bekannt ist, daß das zweite His der Kette in vorletzter Position am C-Terminus steht.

Durch Subtraktion der bekannten O VIII, R IIIb und R Ib sowie der Sequenz Ala (Leu Gln) Lys von den großen peptischen Peptiden findet man, daß letztere um 1 Lys und 2 Leu bei PO Id, um 1 Lys und 1 Leu bei PR Ic und um 1 Lys bei PO Ie über das Arg in Position 97 hinausragen müssen. Daraus ergibt sich eine Arg-Lys-Sequenz, die das Auftreten eines weiteren freien Lys bei der tryptischen Spaltung sowie die zu hohen Lys-Werte von R XIId und R XVIf erklärt.

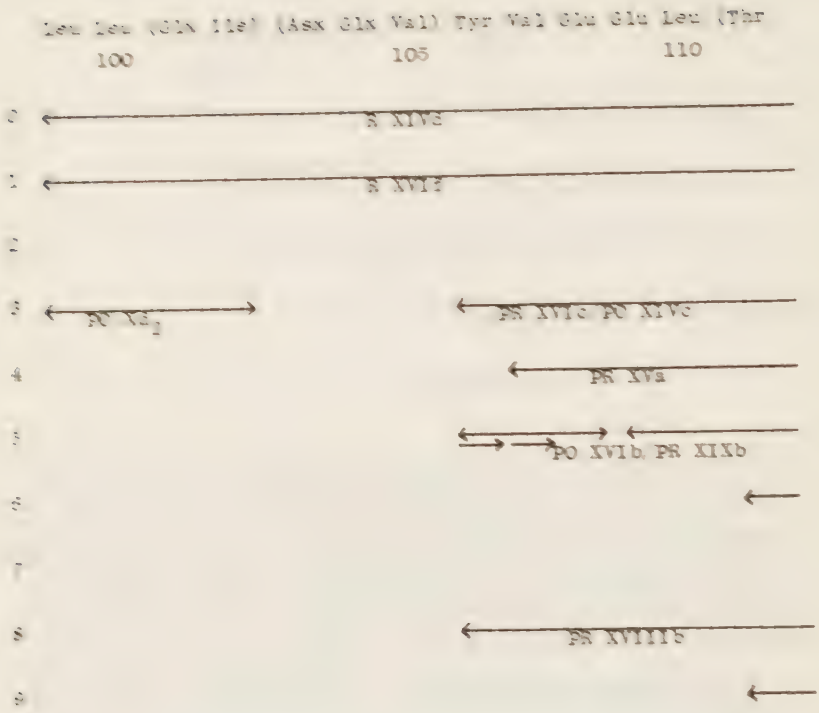
PR IId_3 schließt an PR IIg an und enthält damit alle Aminosäuren von R Ib bis auf 1 Ala, zusätzlich aber auch noch ein Lys und 2-3 Leu.



PR IId_3 gab bei der Aminosäureanalyse, neben sonst sehr guten Ergebnissen, einen viel zu hohen Wert für Leu (4,86). Deswegen wurde die Analyse auch nicht in die Tabellen aufgenommen, doch kann dieser Befund damit erklärt werden, daß PR IId_3 etwa den gleichen R_f-Wert wie Leu hat und darum über Papier nicht Leu-frei erhalten worden ist.

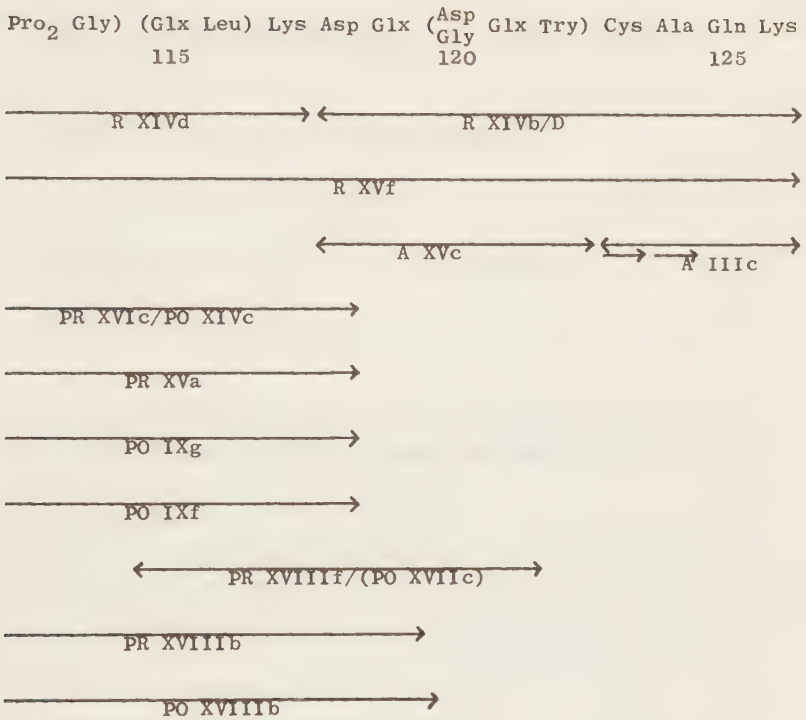
Die Überlappung zum nächsten tryptischen Peptid besteht an dieser Stelle also aus 2 Leu. Von den 5 tryptischen Peptiden, die überhaupt mehr als ein Leu enthalten, fällt R X aus, weil es das C-terminale Peptid ist. O XIIIa und O XVIIIb sind bereits eindeutig vergeben, und von O IXa wurde durch Edman-Abbau Ser als erste Aminosäure ermittelt. So bleibt nur R XIVd, das allerdings so schlecht löslich ist, daß kein Edman-Abbau davon erhalten werden konnte. Aber auch so reicht die Information für eine Zuordnung aus.

R XVIf liefert sofort den Anschluß an R XIVd, da es als ditryptisches Peptid gefunden wurde. Auch an dieser Stelle handelt es sich um die schlechte Spaltbarkeit einer Lys-Asp-Bindung, die aber durch das Gly in Position 120-22 sowie durch die Cysteinsäure in Position 123 beeinflußt zu werden scheint, denn im A-Lauf wurden A XVc und A IIIc (Seite 49, Zeile 2) in guter Ausbeute erhalten.



Die übrigen Peptischen Peptide aus diesem Bereich enden fast alle mit dem Asp in Position 118 und lassen sich tryptisch nicht nachspalten. In den Zeilen 3, 4, 5 und 8 reichen sie bis zu dem Tyr in Position 106 zurück oder können bis dahin zusammengesetzt werden. Dadurch ist die Position dieses Tyr genau gegeben. Edman-Abbau von PO XVIb ergab, daß es sich bei diesem Peptid nicht um eine Überlappung über das Tyr in Position 20 handeln konnte.

PO Xd_2 läßt sich nur hier unterbringen und bestärkt damit die Annahme des Leu-Leu-Anfangs von S XIVc. Das Peptid Asx, Glx, Val von 103 bis 105 wurde nicht gefunden, obgleich es in größerer Menge zu erwarten wäre. Wenn es ein Glu oder Gln am Anfang haben sollte, konnte es jedoch leicht über-

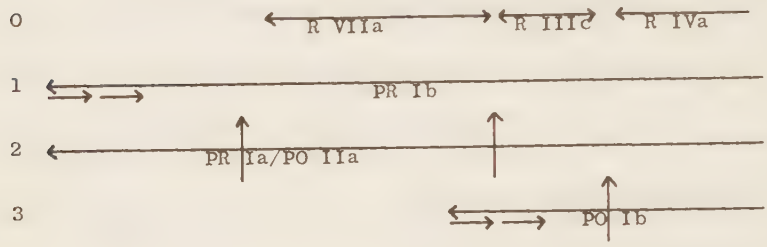


sehen worden sein, weil dann die Bildung des Lactams Pyrrolidon zu erwarten ist, die das Peptid mit Ninhydrinreagenz nicht mehr anfärben läßt.

Die Lage von PR XVIIIf ist durch das darin enthaltene Try eindeutig bestimmt, PR XVIIIb und PO XVIIIb enthalten auch die 2 Pro und das Gly, die für diesen Bereich so außerordentlich charakteristisch sind.

In Position 108 und 109 müssen zwei Glu stehen, weil das die einzige Erklärung dafür ist, daß die Peptide PO XVIb und PR XIXb so stark sauer sind. Das Asp in Position 118 ergibt sich auf Grund der schlechten Spaltbarkeit, das in der Austausch-Position muß ohnehin gefordert werden, weil es die einzige Ursache für den Ladungsunterschied der Gesamtproteine A und B ist.

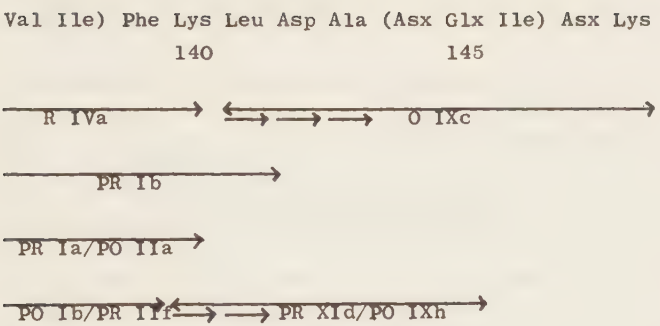
Ala Gln Lys Lys (Glu Ala Ile_2) Lys Thr Lys (Pro Ala
125 130 135



Für die Überlappung zu weiteren tryptischen Peptiden geben PR Ib und PO IIa die Information. Die tryptische Nachspaltung von PO IIa ergab R VIIa, R IIIc, R IVa und ein Spaltstück Lys_2, Ala, Glu. Letzteres bildet die Überlappung zu R XIVb, denn dessen Teilpeptide A IIIc (Seite 49, Zeile 2) mit der durch Edman-Abbau bestimmten Sequenz Ala-Glu-Lys paßt genau dazu. Außerdem gab der Edman-Abbau von PR Ib ebenfalls die Sequenz Ala-Gln.

Hier ist nun auch die Bindung, die das dritte freie Lys der tryptischen Spaltung erklärt, denn es ist sicher, daß die Sequenz von 124 bis 127 Ala-Gln-Lys-Lys lauten muß. Unklar bleibt dagegen bisher die Reihenfolge der Peptide R VIIa, R IIIc und R IVa in der Kette. Durch Edman-Abbau von PO Ib, welches offensichtlich die Überlappung zwischen R IIIc und R IVa bildet, wurde Lys-Thr gefunden. Da R IIIc die Sequenz Thr-Lys hat, muß PO Ib mit Lys-Thr-Lys beginnen. Das stimmt auch mit dem Ergebnis der tryptischen Nachspaltung überein, wo Lys_2, Thr und Pro, Ala, Val, Ile, Phe gefunden wurden. Damit hat sich ergeben, daß R IIIc vor R IVa steht.

PO Ib beginnt mit einem und endet vor einem Lysin. Pepsin hat hier, als Ausnahmefall der negativen Spezifität, vor Lysin gespalten und zwar gleich an zwei Stellen. Da die Spaltung von Phe-Lys-Sequenzen durch Pepsin beobachtet wurde[22], kann man vermuten, daß in Position 139 ein Phenylalanin steht.



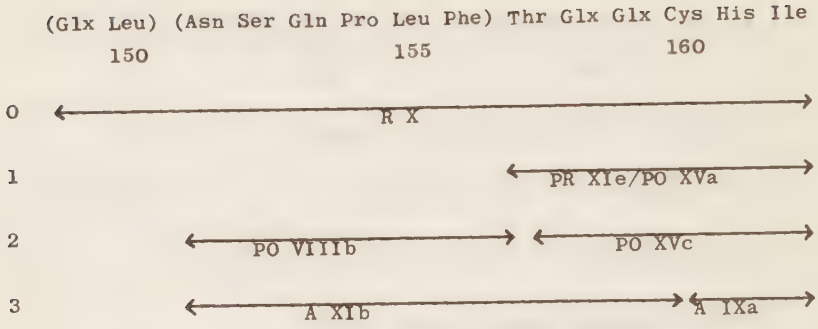
Auch das an PO Ib anschließende peptische Peptid PR IXd wurde in guter Ausbeute erhalten und gab beim Edman-Abbau die Sequenz Lys-Leu.

PR XId bildet also die Überlappung von R IVa zum nächsten tryptischen Peptid. Das kann nur noch entweder R VIIa oder O IXc sein, denn sonst sind alle tryptischen Peptide bis auf das C-terminale R X bereits in der Kette untergebracht. Die 2 Asx von PR XId schließen R VIIa als Folgepeptid für R IVa völlig aus, so daß sich nun die Reihenfolge R VIIa, R IIIc, R IVa, O IXc ergibt, denn R VIIa, das ja wegen PR Ib neben PO Ib stehen muß, kann nun nicht mehr hinter PO Ib gehören.

Da die Überlappung Lys-Leu nicht sehr weitreichend ist, wurde von O IXc zur Sicherheit ein Edman-Abbau durchgeführt, der Leu-Asp-Ala ergab, so daß diese Zuordnung damit völlig sicher ist.

R VII a muß als Neutralpeptid Glu enthalten und der Edman-Abbau von O IXc hat in Position 142 Asp ergeben, weitere Aussagen können über die Asx und Glx in diesem Bereich nicht gemacht werden.

Nachdem nunmehr nur noch R X nicht zugeordnet ist, muß es an O IXc anschließen. Die Information, daß R X das C-terminale Peptid ist, muß hier an die Stelle einer Überlappung treten, denn ein Überlappungspeptid wurde nicht gefunden.



Das fehlende Peptid sollte die Zusammensetzung Lys, Asx, Glx, Leu haben, und es bleibt unklar, warum es nicht gefunden werden konnte. Die übrigen Teile von R X sind in guter Ausbeute erhalten worden, und aus ihnen kann man die Sequenz der letzten 6 Aminosäuren entnehmen. PO VIIIb kann als Neutralpeptid nur Asn und Gln enthalten, es muß zu R X gehören, da es kein Lys aber Thr und Ser gleichzeitig enthält und R X das einzige tryptische Peptid mit Thr und Ser ist. PR XIe ist ein Neutralpeptid, es muß folglich ein Glu und ein Gln enthalten, doch ist über deren Reihenfolge nichts bekannt.

Mit der Aufstellung der Partialformel sind bereits 71 Aminosäuren ihrer Position in der Kette eindeutig zugeordnet. Der letzte Schritt der Sequenzanalyse am ß-Lactoglobulin muß noch darin bestehen, durch Edman-Abbau an den vorhandenen Peptiden, die richtige Reihenfolge der in den Klammern stehenden Aminosäuren zu finden.

V. Diskussion

a. Betrachtung der Fehlermöglichkeiten

Bei der Betrachtung jedes Analysenergebnisses stellt sich die Frage nach Art und Größe möglicher Fehler. Da eine Partialformel ein komplexes Analysenergebnis ist, gibt es bei ihr zwei grundsätzlich verschiedene Arten von Fehlermöglichkeiten:

1.) Fehler in der Einzelanalyse wie: Aminosäureanalyse der Peptide und Edman-Abbau an Peptiden und Proteinen.

2.) Fehler bei der Kombination der einzelnen Analysenergebnisse zum Gesamtergebnis.

Fehler der ersten Gruppe können für die Aminosäureanalyse nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Peptidanalyse nicht alle durch Mehrfachbestimmungen gesichert sind. Die Wahrscheinlichkeit für solche Fehler ist dennoch sehr gering, denn die Peptidanalyse hat in sich den Charakter einer Mehrfachbestimmung; es werden mehrere Aminosäuren unter genau gleichen Bedingungen nacheinander bestimmt. Annähernd ganzzahlige Molverhältnisse, sowie die nahezu völlige Abwesenheit solcher Aminosäuren, die nicht zu dem untersuchten Peptid gehören, sind sehr gute Kriterien für die Richtigkeit der Analyse. Die Hauptfehlermöglichkeit liegt in der Hydrolyse, bei der einige Aminosäuren zum Teil zerstört werden, andere bei der Standardhydrolysezeit von 20 Stdn. noch nicht völlig in Freiheit gesetzt sind. Durch gut bekannte Zerfallskonstanten der hydrolyselabilen Aminosäuren[23)], sowie durch Kontrolle unsicherer Valin- und Isoleucin-Werte nach 100 stündiger Hydrolyse, wurde diese Fehlermöglichkeit weitgehend eingeschränkt. Für die tryptischen Peptide ist deren Summierbarkeit zur Gesamtanalyse eine unabhängige Probe auf Richtigkeit.

Die größten Fehlermöglichkeiten liegen beim Edman-Abbau. Fehlinterpretationen sind bei den Papierchromatogrammen der PTH-Aminosäure nicht völlig auszuschließen. Daß nach völligem Abbau eines Peptids alle Aminosäuren, aus denen es bestand,

wiedergefunden sein müssen, ermöglicht jedoch eine nachträgliche Bestätigung. Da in der vorliegenden Arbeit diese Kontrolle noch nicht möglich war, wurde der besonders wichtige Edman-Abbau am N-terminalen Peptid und am Gesamtprotein, durch einen Aminopeptidase-Abbau gesichert.

Bei der Aufstellung der Partialformel wird für die Überlappung jeder peptischen Spaltstelle mindestens eine eindeutige Information benötigt. Jede zusätzliche Information hat hier den Charakter einer Mehrfachbestimmung. In die Partialformel lassen sich alle 98 gewonnenen Peptide eindeutig und widerspruchslos einordnen. Damit kann die Reihenfolge der tryptischen Peptide als gesichert gelten. Möglich ist lediglich noch, daß einzelne Aminosäuren oder Aminosäuregruppen innerhalb der tryptischen Peptide nicht ganz richtig eingeordnet wurden. Ein von Kalan et al.[11] veröffentlichtes chymotryptisches Peptid aus dem Asp-Gly-Austauschbereich mit der Zusammensetzung: Lys_4, $Asp^2/1$, Thr, Glu_4, Pro, $Gly^0/1$, Ala_3, Cys, Val, Ile_2, Phe, läßt sich als 99stes Peptid in die Partialformel einfügen. Bis auf die Differenz von einem Isoleucin paßt es in die Positionen 117 bis einschließlich 139. Das eine Isoleucin, welches bei Kalan fehlt, wird bei der Hydrolyse schwer freigesetzt (vermutlich Ile-Ile-Bindung), denn das tryptische Peptid R VIIa gab auch nach 20 stündiger Hydrolyse erst 1,2 Ile.

b. Betrachtungen zum Ergebnis

Die Sequenz des ß-Lactoglobulins weist, soweit sie sich aus der Partialformel bereits erkennen läßt, nur zwei auffällige Bereiche auf:

Der eine ist die Cys-Cys-Bindung in Position 69-70, die einen erheblichen Einfluß auf die Überstrukturen des ß-Lactoglobulins haben kann. Sind die beiden Cys durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft, so ist eine α-Helix dort unmöglich. Sind sie mit je einem anderen Cys der Kette verknüpft, dann laufen an diesem Punkt drei Stränge zusammen. Nur wenn eines

dieser beiden Cysteine mit freier SH-Gruppe vorliegt, hat diese Cys-Cys-Bindung keine besondere Auswirkung auf die Überstruktur.

Der zweite bemerkenswerte Bereich ist die Cys-His-Bindung in Position 160-161. Bei nur 2 His und 5 Cys in der Gesamtkette von 162 Aminosäuren ist die Wahrscheinlichkeit für diese Kombination sehr gering. Das erlaubt die Vermutung, daß diese Sequenz bei der Evolution des ß-Lactoglobulins begünstigt gewesen sein kann. Die Tatsache, daß die Kombination von Cystein mit Histidin mehrfach in den aktiven Bereichen von Enzymen aufgefunden wurde, weist auf enzymatische Eigenschaften hin, die das ß-Lactoglobulin möglicherweise einmal gehabt hat, oder sogar noch hat. Es ist zu hoffen, daß die Röntgenstrukturanalyse, durch Ermittlung der räumlichen Lage dieser Cys-His-Sequenz, bald weitere Anhaltspunkte gibt, die es ermöglichen, die Frage nach der biologischen Bedeutung des ß-Lactoglobulins zu beantworten.

Experimenteller Teil

1. ß-Lactoglobulin, Gewinnung und Endgruppenbestimmungen

a. Darstellung von kristallisiertem ß-Lactoglobulin

Durchführung: 20 l entrahmte, nicht pasteurisierte Milch wurden auf 25° erwärmt und unter Rühren mit einem Holzloffel langsam mit n Salzsäure versetzt, bis ein pH von 4,6 erreicht war (ca. 3 l). Die Lösung wurde 30 Minuten stehen gelassen, dann wurde das pH abermals eingestellt. Um das Casein abzufiltrieren, wurden zwei 30 cm Trichter verwendet, in die je 6 Glasstäbe eingelegt waren, auf denen eine aus Baumwollnessel gefertigte Einlage rührte. Die Glasstäbe waren am oberen Ende zu einem engen U umgebogen, so daß sie am Trichterrand eingehängt werden konnten. Ihre Länge war so bemessen, daß sie 1 cm über dem Trichterrohr aufhörten. In die Stoffeinlagen wurden dann je ein normales Filter (Schleicher und Schull) gelegt. Durch die Glasstäbe wird - wie beim Faltenfilter - ein Ankleben des Filters an die Glaswand verhindert. Die Stoffeinlage macht die Verwendung eines sehr dünnen Filtrierpapiers möglich und saugt das Filtrat obendrei mittels Kapillarkraft durch die eigentliche Filterschicht. So gelang es mit dieser Anordnung, die gesamte Molke in etwa vier Stunden abzufiltrieren.

Die Molke wurde mit n Ammoniak auf pH 6,0 eingestellt, dann wurden pro Liter Lösung 358 g Ammonsulfat hinzugegeben. Der Niederschlag wurde auf die gleiche Weise filtriert, wie das Casein. Am Abend des ersten Tages der Aufarbeitung war die zweite Filtration gerade so weit fortgeschritten, daß die restlichen Flussigkeiten restlos auf die Filter gegeben werden konnten. Am anderen Morgen wurden die Niederschläge von den Filtern genommen und mit einer ihrem Gewicht gleichen Menge Wasser gelöst. Die Lösungen wurden mit n Salzsäure auf pH 4,0 eingestellt und bei 4° bis zum nächsten Morgen stehen gelassen,

dann wurde das ausgefallene α-Lactalbumin hochtourig abzentrifugiert.

Der Überstand, der nahezu nur noch ß-Lactoglobulin enthält, wurde mit n Ammoniak auf pH 5,7 eingestellt und in Anwesenheit von etwas Toluol eine Woche im Kältelaboratorium gegen Wasser dialysiert. Das Außendialysat wurde täglich gewechselt. Danach wurde die Lösung auf pH 5,2 eingestellt und drei Tage weiter dialysiert, wobei das ß-Lactoglobulin zuerst als Öl ausfiel. Aus der dann dünneren Lösung fiel das weitere Material kristallin aus und das Öl begann bei der Berührung mit den Kristallen ebenfalls durchzukristallisieren. Das Produkt wurde auf einem Büchnerfilter gesammelt, mehrmals mit Wasser und zum Schluß mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 23,6 g.

b. Säulenchromatographische Reinigung von ß-Lactoglobulin

Die chromatographische Reinigung erfolgte auf einer DEAE-Cellulose-Säule, die 30 cm lang und 1,5 cm weit war. Die Apparatur befand sich im Kältelaboratorium bei 4^{o}. Die Cellulose war mit 0,05 m Phosphatpuffer auf pH 5,8 äquilibriert. 3 g des Rohmaterials wurden in 30 ml dieses Puffers gelöst und 18 Stdn. bei 4^{o} gegen diesen Puffer dialysiert. Die Lösung wurde auf die Säule gebracht und folgendes Gradientensystem angeschlossen: Vor der Säule ein Mischgefäß mit 450 ml des Phosphatpuffers, in dem 1,05 g Kochsalz gelöst waren und hinter dem Mischgefäß ein Vorrat von 450 ml des Puffers, der 7,9 g Kochsalz enthielt.

Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 15 ml pro Stunde eluiert und alle 20 Minuten eine Fraktion abgenommen. Durch ein, mit dem Fraktionssammler synchron geschaltetes, Durchflußphotometer (Uvicord von LKB), war es möglich, die Fraktionen mit dem ß-Lactoglobulin direkt zu ermitteln. Sie wurden vereinigt, gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Aus 12 g Rohmaterial wurden 9 g gereinigtes Produkt erhalten.

c. Endgruppenbestimmungen

Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mittels Hydrazinolyse.

Ca. 10 mg des Präparats wurden mit 0,5 ml wasserfreiem Hydrazin versetzt, eingeschmolzen und 9 Stunden im Wasser auf 100° erhitzt. Danach wurde die Probe mit Wasser verdünnt, einrotiert und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand wurde mit 1,5 ml Wasser aufgenommen und die Hydrazide durch halbstündiges Schütteln mit 0,5 ml Benzaldehyd in die Schiff'schen Basen überführt, die mit Äther ausgeschüttelt wurden. Die Analyse der wässrigen Phase ergab nur Isoleucin.

Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren mit Carboxypeptidase.

20,6 mg des Präparats wurden in 2 ml 0,1 n Na-Boratpuffer pH 8,5 gelöst und mit ca. 150 γ Carboxypeptidase A (Boehringer) in 0,15 ml 10 %-iger Lithiumchloridlösung versetzt. Dann wurde 4 Stdn. bei 37° inkubiert und anschließend die Spaltung durch Zusatz von 1 ml Eisessig unterbrochen. Die Lösung wurde einrotiert und 1/5 davon zur Aminosäureanalyse verwendet. Die quantitative Bestimmung ergab 0,157 µMol Isoleucin und 0,074 µMol Histidin. Andere Aminosäuren wurden nicht gefunden.

Bestimmung der N-terminalen Aminosäure nach Stark und Smyth.

Ein Gemisch von 4 ml Äthylmorpholin und 4 ml Wasser wurde mit Eisessig auf pH 8 eingestellt, dann wurden 4,8 g Harnstoff darin gelöst. 100 mg Protein wurden in 5 ml 8 m Harnstofflösung gelöst, mit 5 ml des Morpholinpuffers gemischt, mit 0,5 g Kaliumcyanat versetzt und über Nacht auf 50° erwärmt. Am nächsten Tag wurden unter Rühren vorsichtig 10 ml Eisessig hinzugegeben (Aufschäumen!), und nach Verdünnen mit Wasser auf etwa das doppelte Volumen wurde das ausgefallene "Carbamylprotein" abzentrifugiert. Es wurde mehrmals mit Wasser und schließlich mit Aceton gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die glasige Masse wurde fein pulverisiert, etwa 10 mg davon wurden in 2 ml 50 %-iger Essigsäure gelöst und mit 2 ml 12 n Salzsäure versetzt. Die Lösung wurde unter Vakuum eingeschmolzen und eine Stunde im Wasserbad auf 100° erhitzt, wobei sie sich vorüber-

gehend durch zerfallendes Tryptophan tief violett färbte. Die Flüssigkeit wurde einrotiert, mit 1 ml Wasser aufgenommen und auf eine Chromatographiesäule mit Ionenaustauscherharz Dowex 50x2 (200 bis 400 mesh) in der H^+-Form gegeben, die 10 cm hoch und 0,9 cm weit war. Die Säule wurde mit Wasser eluiert, nur die Hydantoine ohne kationische Gruppen liefen frei durch. Die ersten 30 ml des Eluats wurden einrotiert, mit 2 ml 0,2 n Natronlauge aufgenommen, eingeschmolzen und 24 Stdn. bei 110° hydrolysiert. Das Hydrolysat gab bei der Aminosäureanalyse nur Leucin.

II. Reaktionen am ß-Lactoglobulin (Gesamtprotein)

a. Aminoäthylierung des Cystins und Cysteins

Als Ausgangsmaterial diente ein reines kristallines ß-Lactoglobulin B, das aus der Milch einer einzigen homozygoten Kuh gewonnen wurde.

Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung wurden ohne Isolierung von Zwischenprodukten durchgeführt. An Stelle einer großen Puffermenge zum Abfangen der Eigenbasizität des Azirans, wurde ein Autotitrator verwendet. Dadurch konnte die notwendige Flüssigkeitsmenge auf etwa 1/50 verringert werden, und die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes vereinfachte sich.

Zur Umsetzung von 1 g ß-Lactoglobulin wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

100 ml	8 m Harnstofflösung
4 ml	1 m Tris-Acetatpuffer pH 8,6
1 ml	ß-Mercaptoäthanol
6,5 ml	Aziran
	Ameisensäure zum Neutralisieren.

Ein 200 ml Becherglas mit Kühlmantel wurde mit der Harnstofflösung gefüllt und mit einem Magnetrührer versehen. Unter Rühren wurde das Protein aufgelöst, dann wurde das Glas mit

einem dreifach durchbohrten Korkstopfen verschlossen. Die Bohrungen wurden mit einem fest eingepaßten Zufluß vom Autotitrator, einer 3 mm weiten Zuleitung und einem 3 mm weiten Ausgangsrohr für Stickstoff versehen. Die Stickstoffzuleitung reichte in die Flüssigkeit hinein, die Ableitung diente gleichzeitig zur Zugabe von Reagenzien, welche mittels einer Spritze mit Kanüle eingegeben wurden.

Unter langsamem Rühren wurde 2 Stdn. Stickstoff durchgeleitet, nachdem etwas Oktanol gegen das Schäumen zugesetzt worden war. Darauf wurde der ß-Mercaptoäthanol hinzugefügt und ohne Rühren 3 Stdn. in schwachem Stickstoffstrom stehen gelassen. Dann wurde mit Leitungswasser gekühlt und das Aziran in 2-minütigen Abständen in Portionen von etwa 1 ml langsam eingetragen. Gleichzeitig wurde aus dem Autotitrator 95 %-ige Ameisensäure zur Erhaltung des eingestellten pH 8,5 zugesteuert. Nach 15 Minuten war das Eintragen von Aziran beendet, die Lösung wurde dann noch 30 Minuten im Stickstoffstrom stehen gelassen.

Es wurden etwa 120 ml Lösung erhalten, die mit weiteren 120 ml quantitativ in einen Dialysierschlauch überspült wurden. Nach 2-tägiger Dialyse gegen destilliertes Wasser war eine reichliche Menge Substanz amorph ausgefallen. Die Suspension wurde eingefroren und lyophilisiert.So wurden 940 mg des AEC-Derivates erhalten, entsprechend ca. 94 % der Theorie.

b. Perameisensäureoxidation

Um Halogenierungen des Tyrosins zu vermeiden, müssen alle Reagenzien und das Ausgangsmaterial halogenfrei sein.

5 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid (Perhydrol) und 45 ml 88 %-ige Ameisensäure wurden gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die so erhaltene etwa 5 %-ige Perameisensäure (in 75 %-iger Ameisensäure) wurde in Eiswasser auf $0^{o}C$ gekühlt. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurden portionsweise 2 g ß-Lactoglobulin eingetragen. Bis zur vollständigen Auflösung der Substanz waren 15 Minuten erforderlich. Die Lösung wurde 3 Stdn. im Eisbad belassen, dann mit Wasser auf 100 ml

verdünnt und mit 10 g Natrium-Acetat versetzt. Danach fiel das Protein größtenteils aus und wurde als Suspension in einen Dialysierschlauch gebracht. Dialysiert wurde 4 Stunden gegen 2 l 20 %-ige Essigsäure, über Nacht gegen 4 l 10 %-ige Essigsäure und weitere 48 Stunden gegen 4 mal 2 l n/16 Salzsäure.

Das Protein blieb in Suspension und wurde so zur peptischen Spaltung verwendet.

c. Reduktion zu freien SH-Gruppen

2 g ß-Lactoglobulin wurden in 50 ml 8 m Harnstofflösung gelöst, mit 1 n Natronlauge auf pH 9 eingestellt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darauf wurde die Lösung mit 2 ml ß-Mercaptoäthanol versetzt. 3 Stdn. verschlossen stehen gelassen und mit 6 n Salzsäure auf pH 1,5 angesäuert. Anschliessend wurde 48 Stdn. gegen 4 mal 4 l n/16 Salzsäure dialysiert und das Produkt zur peptischen Spaltung verwendet.

III. Enzymatische Spaltungen am ß-Lactoglobulin

Verwendete Enzyme: Trypsin (3.4.4.4.) 2 x krist. lyophil. reinst, salzfrei, frei von Chymotryps. ca. 10 000 EU pro mg.

Pepsin 3 x krist. reinst (vom Rind).

Beide wurden von der Firma Serva geliefert.

Das Trypsin wurde vor der Verwendung 16 Stdn. mit n/16 Salzsäure bei 37°C inkubiert um eventuelle chymotryptische Restaktivitäten zu beseitigen.

a. Tryptische Spaltung des AEC-ß-Lactoglobulins

0,9 g des AEC-Produktes wurden in einem Temperiergefäß in 50 ml Wasser suspendiert und bei 37°C mit 10 mg Trypsin in 1 ml n/16 Salzsäure versetzt. Mit n/10 Natronlauge aus dem Autotitrator wurde auf pH 8,0 eingestellt, und die Spaltung begann unter offensichtlich gleichmäßigen Laugeverbrauch. Nach einer

Stunde war aus der groben Aufschlämmung eine homogene, wenig getrübte Lösung geworden. 4 Stdn. nach Beginn der Spaltung fand kein merklicher Laugeverbrauch mehr statt, der Autotitrator wurde abgeschaltet und das Reaktionsgemisch noch weitere 4 Stdn. bei 37° stehen gelassen. Dann wurde mit Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt, eine geringe Menge Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand für die Dowex 1x2-Chromatographie verwendet.

b. Peptische Spaltung des oxidierten und reduzierten ß-Lactoglobulins

Beide Derivate wurden völlig parallel behandelt. Sie lagen nach der Dialyse in n/16 Salzsäure vor, und das reduzierte Material wurde mit n/16 Salzsäure auf 100 ml verdünnt, so daß beide Proben auch das gleiche Volumen hatten. Sie wurden im Brutschrank auf 37°C vorgewärmt und mit 10 mg Pepsin in 1 ml n/16 Salzsäure versetzt. Bei je 2 g Substanz entspricht das nur der Hälfte der allgemein üblichen Enzymmenge.

Der ursprüngliche Niederschlag des oxidierten Materials löste sich innerhalb 3 Minuten nach Enzymzugabe völlig auf. Nach 4,5 Stdn. wurde die Spaltung durch Abkühlen auf 0° stark verlangsamt und sofort mit der Weiterverarbeitung der Proben begonnen. Diese wurden auf etwa 10 ml einrotiert und mit je 10 ml Eisessig versetzt. Beim weiteren Einrotieren wurde die Salzsäure mit der Essigsäure größtenteils abdestilliert, und durch mehrmaliges Verdünnen mit Wasser und wieder Einrotieren wurde die Essigsäure auch zum großen Teil wieder entfernt. Dieses Verfahren ist erforderlich, weil Chlorid-Ionen die anschließende Chromatographie stören können. Die Proben wurden in 15 ml Wasser aufgenommen, mit je 1 ml ß-Mercaptoäthanol versetzt, mit Natrolauge auf pH 9,5 eingestellt und auf 50 ml verdünnt. In dieser Form wurde das Material dann auf die Chromatographiersäule aufgetragen.

IV. Reinigungsmethoden für Peptide (Ionenaustauscher-chromatographie)

a. Allgemeines:

Für gute Trennungen ist eine gleichmäßige Durchströmung der Säulen notwendig, die sich durch entsprechende Füllverfahren erreichen läßt. Die Säulen werden zunächst mit Äquilibrierpuffer gefüllt, dann läßt man eine Suspension des Austauschers (ca. 1 Teil sedimentierten Austauscher und 3 Teile Puffer) nachfließen. Unter ständigem Ausfließen des Puffers steigt das Säulenbett gleichmäßig an, bis die gewünschte Höhe erreicht ist; dann wird wieder Äquilibrierpuffer angeschlossen. Bei langen Säulen wird der Austauscher durch Rühren in Suspension gehalten und mittels eines weiten Schlauches in die Säule hineingehebert. Die Füllung verlief so in Zeiträumen von mehr als einer Stunde praktisch unbeaufsichtigt.

Nach dem Füllen wurde mit Äquilibrierpuffer die Fließgeschwindigkeit reguliert (Peristaltik-Schlauchpumpe). Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Fließgeschwindigkeit ohne Pumpe etwas geringer ist als mit Pumpe, damit ein kleiner Überdruck entsteht. Dieser Überdruck ist notwendig, um Gasabscheidungen in der Säule zu vermeiden, und muß notfalls durch teilweises Schließen eines Dosierhahnes am Säulenauslauf erzeugt werden, weil Puffer bei der Bereitung von Gradienten mit Gas gesättigt werden, das bei der höheren Temperatur in der Säule leicht abgegeben werden kann.

Die Gradienten wurden in geschlossenen Mischgefäßen bereitet, wobei mehrere, jeweils stärkere, Puffer nacheinander an das gleiche Mischgefäß angeschlossen wurden, ohne daß der jeweilige Inhalt des Mischgefäßes entfernt wurde. Wenn dieses Umwechseln in der Nacht geschehen mußte, wurde ein Dreiwegeschlauchsystem verwendet, das durch eine Schaltuhr umgeschaltet wurde.

Die Fraktionierung geschah mit einem der üblichen Fraktionssammler. Aus jeder Fraktion wurde eine Probe (zwischen 0,1 und 0,5 ml) entnommen. mit 1 ml 2,5 n Natronlauge 3 Stdn. hydrolysiert, dann mit 1 ml 20 %-iger Essigsäure sowie mit 1 ml Ninhydrinreagenz nach Stein und Moore versetzt. Darauf wurde 15 Minuten auf 100° erhitzt, abgekühlt und mit 5 ml 50 %-igem Äthanol verdünnt. Die Stärke der Färbung wurde im Photometer (Eppendorf) bei 578 nm gemessen und automatisch registriert. So wurden die Kurven erhalten, die in den Abbildungen dargestellt sind.

Um in zwei Säulen völlig vergleichbare Trennungen zu erhalten, genügt es nicht, die Läufe nacheinander durchzuführen und alle Parameter beim zweiten Lauf genauso einzustellen wie beim ersten. Die Reproduzierbarkeit ist nicht besonders gut, und kleine Schwankungen bewirken während der relativ langen Laufzeit Verschiebungen, die sich nicht kontrollieren lassen. Durch Parallelläufe kann man dagegen vergleichbare Chromatogramme erhalten, d. h. gleiche Substanzen erscheinen in beiden Läufen auch in den gleichen Fraktionen.

Dazu werden gleich dimensionierte Säulen mit dem Austauscher aus einer Aufarbeitung gleichzeitig gefüllt. Es wird nur eine Schlauchpumpe verwendet und der gleiche Schlauch wird zweimal parallel eingezogen. Am Ansaugende werden die Schläuche durch ein Y-Rohr zu einem Schlauch zusammen geführt, der an ein gemeinsames Mischgefäß für die Gradientenbereitung angeschlossen wird, welches doppelt soviel Puffer enthält wie bei einzelnen Läufen. Die beiden Druckenden des Pumpsystems werden je an eine Säule angeschlossen, und die Eluate werden in zwei parallelen Reihen eines Fraktionssammler aufgefangen.

Alle Differenzen liegen nun nur noch in der Probenaufbereitung und Auftragung.

b. Dowex 1x2-Chromatographie:

Der verwendete Austauscher, Dowex 1x2, 200-400 mesh, liegt entweder als neues Material in der Chloridform oder gebraucht in der Acetatform mit Verunreinigungen vor. Er muß in möglichst reine Acetatform überführt werden. Dazu wird in einer weiten Säule (5-10 cm Durchmesser) mit 1 n Natronlauge gewaschen. Die Fließgeschwindigkeit soll dabei 2 ml pro Minute und cm^2 Säulenbett nicht überschreiten, doch wird diese Geschwindigkeit bei den erforderlichen Harzmengen kaum erreicht. Bei bereits gebrauchtem Harz verwendet man das Zehnfache des Harzvolumens an Natronlauge, bei neuem Harz braucht man ein Vielfaches davon und muß das Ende der Prozedur durch Prüfung des Eluates mit Silbernitrat feststellen. 1 ml Eluat, mit 2 ml n Salpetersäure und einigen Tropfen Silbernitratlösung versetzt, darf nur noch eine opalisierende Lösung ergeben, aus der sich innerhalb von 5 Minuten kein Niederschlag zusammenballt. Danach wird mit dem 5-fachen Harzvolumen an destilliertem Wasser gewaschen (pH 9) und mit 1 n Essigsäure in die Acetatform überführt (pH 2). Anschließend wird, möglichst über Nacht, mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und dann mit Äquilibrierpuffer aufgeschlämmt. Endgültig äquilibriert wird in der bereits fertig gefüllten Säule, und zwar so lange, bis das pH des Eluates das pH 8,4 des Puffers auf 0,05 Einheiten entspricht. Dann wird die Substanz aufgetragen, die zuvor auf pH 9,5 eingestellt wurde.

In allen drei Läufen wurden Säulen von 1,50 m Länge und 2 cm Durchmesser verwendet, die auf 40°C temperiert wurden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 40 ml in der Stunde, entsprechend 4 Fraktionen à 10 ml. Die Mischgefäße enthielten zu Beginn der Läufe 750 beziehungsweise 1500 ml Äquilibrierpuffer.

Folgende Puffer wurden an die Mischgefäße angeschlossen:

1.) Äquilibrierpuffer
15 ml 2,4,6 Collidin, 15 ml 2,4 Lutidin und 15 ml α-Picolin auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt und mit Eisessig auf pH 8,4 eingestellt.

2.) nach 20 Fraktionen
20 ml 2,4 Lutidin, 20 ml α-Picolin und 30 ml Pyridin auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt und mit Eisessig auf pH 7,6 eingestellt.

3.) nach 80 Fraktionen
40 ml α-Picolin, 40 ml Pyridin und 5 ml Eisessig auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. pH 6,7

4.) nach 150 Fraktionen
50 ml α-Picolin, 50 ml Pyridin und 20 ml Eisessig auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. pH 6,0

5.) nach 220 Fraktionen
50 ml α-Picolin, 50 ml Pyridin und 80 ml Eisessig auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. pH 4,8

6.) nach 300 Fraktionen
50 ml Pyridin und 950 ml Eisessig gemischt.

7.) nach 380 Fraktionen
Eisessig.

c. Kationenaustauscher-Chromatographie

Wenn die Anwesenheit von Cysteinsäure im Peptidgemisch es nicht unmöglich machte, wurde mit phsophorylierter Zellulose gearbeitet. Das Material (Fa. Whatman) wurde, nach Quellung in Wasser, durch Dekantieren von schwebenden Partikeln befreit, dreimal mit eisgekühlter 0,5 n Salzsäure gewaschen (Austauschersediment zu Salzsäure wie 1:1), und auf einem Büchnerfilter abgesaugt. Danach wurde mit Wasser bis zu einem pH über 5 gewaschen und in etwa der fünffachen Menge Äquilibrierpuffer suspendiert. Nach dem Absitzen wurde dekantiert und das Verfahren so lange wiederholt, bis der Überstand völlig klar blieb. Bei diesen Arbeiten müssen die verwendeten Flüssigkeiten durch Rühren unter Wasserstrahlvakuum (etwa 10 Minuten) entlüftet sein, damit nicht Austauscherpartikel durch Bildung von Luftblasen aufschwimmen.

Die gebrauchten Säulen wurden nicht ausgeräumt, sondern mit dem stärksten Puffer über Nacht gewaschen und dann wieder äquilibriert. Erst wenn die Säulen sich so weit zusammengepreßt hatten, daß die Fließgeschwindigkeit nicht mehr erreicht werden konnte (nach 4 bis 5 Läufen), wurden die Säulen ausgeräumt, die Zellulose mit 3 n Pyridin-Formiat pH 4,5 gewaschen und anschließend mehrmals mit Äquilibrierpuffer aufgeschlämmt wie bei neuem Material.

Dowex 50x2, 200-400 mesh wurde nur für Peptidgemische mit Cysteinsäure benutzt. Der gequollene Austauscher wurde mit je zweimal dem doppelten Harzbettvolumen 2 n Salzsäure und 2 n Natronlauge gewaschen, zum Schluß mit der Natronlauge. Zwischen den einzelnen Waschungen wird jeweils mit Wasser ausgewaschen, damit keine zu große Neutralisationswärme entsteht. Nach der letzten Laugebehandlung wurde mit Wasser gewaschen, bis das pH kleiner als 8 war, und dann mit Äquilibrierungspuffer aufgeschlämmt, wie bei der phosphorylierten Zellulose. Die Säulen wurden bei 50°C gefüllt, äquilibriert und auch gefahren. Sie können nur einmal verwendet werden, weil der Austauscher mit steigender Ionenstärke schrumpft und bei neuerlichem Äquilibrieren durch Quellung die Säulen zusetzen würde.

Bei der Verwendung von sowohl phosphorylierter Zellulose als auch von Dowex 1 waren die Säulen in der Regel 25 bis 30 cm lang und 0,9 bis 1,0 cm weit. Nur für die Chromatographie tryptisch nachgespaltener peptischer Peptide wurden, wegen der dabei oft sehr einfachen Trennungen, auch Säulen von nur 8 bis 15 cm Länge verwendet.

Zur Elution wurden Pyridin-Formiat-Puffer über geschlossene Mischgefäße mit 100 (bzw. 200 bei Parallelläufen) ml Inhalt an Äquilibrierpuffer angeschlossen. Der Einsatz der Puffer erfolgte stets so, daß in dem pH-Bereich der Elution (aus der Gipfellage bei den Dowex-1-Läufen abschätzbar) möglichst lange verweilt wurde. Dazu brauchten nicht immer alle Puffer eingesetzt zu werden.

Folgende Puffer wurden verwendet:

1.) 0,1 n Pyridin-Formiat pH 3,0
2.) 0,5 n Pyridin-Formiat pH 3,2
3.) 1,0 n Pyridin-Formiat pH 3,4
4.) 2,0 n Pyridin-Formiat pH 3,7
5.) 2,5 n Pyridin-Formiat pH 4,2

Zur Trennung stark saurer Peptide reichten diese Verfahren nicht aus, und für Peptide ohne Cysteinsäure wurde deswegen die Elution mit Salzgradienten von phosphorylierter Zellulose angewendet. Die Proben wurden, in möglichst salzarmer Lösung mit pH 1,8 auf 50 cm lange Säulen gegeben, die aus der H^+-Form des Austauschers über Nacht mit einem auf das Fünffache verdünnten 0,1 n Puffer äquilibriert worden waren. Dieser Puffer befand sich auch in dem Mischgefäß, und als erster Gradient wurde ein auf 0,05 n verdünnter Puffer angeschlossen. Als letzter Puffer diente der 0,1 normale.

V. Enzymatische Spaltungen an Peptiden

Verwendete Enzyme: Trypsin (3.4.4.4.) siehe II.

Carboxypeptidase A 5 x krist. von der Pentex Inc. über Firma Serva.

Aminopeptidase M ca. 5000 mEU pro mg von der Firma Röhm und Haas.

a. Probenvorbereitung

Enzymatische Reaktionen sind in der Regel gegen zu hohe Salzkonzentrationen empfindlich. Besonders kritisch scheint es zu sein, Spaltungen in Gegenwart größerer Mengen von Pyridinium-Verbindungen durchzuführen. Deswegen wurden die Proben vor der Spaltung weitgehend entsalzt. Während die Flüchtigkeit von Pyridin-Acetat und -Formiat nicht ausreicht, um beim Einrotieren salzfreie Produkte zu liefern, führt die Gefriertrocknung wegen der großen Oberfläche zu befriedigenden Ergebnissen.

Die, oft nur sehr kleinen, Flüssigkeitsmengen wurden in ein Reagenzglas gebracht und mit Wasser auf etwa 1 ml verdünnt. Dann wurden die Lösungen unter Schütteln in Aceton-Trockeneis eingefroren und in einen Exsikkator mit Ätznatron und konz. Schwefelsäure gebracht und sofort mit einer Ölpumpe evakuiert. Nachdem die Proben einmal trocken waren, wurde abermals 1 ml Wasser zugegeben und der Vorgang wiederholt. Danach konnte in demselben Glas die Spaltung durchgeführt werden.

b. Tryptische Nachspaltung peptischer Peptide

Etwa 5 bis 10 µmole des Peptids werden in 10 ml 0,05 m Tris-Lösung aufgenommen, mit 50 γ Trypsin in 0,05 ml m/16 Salzsäure versetzt, mit 0,1 n Salzsäure auf pH 8 bis 9 eingestellt, (Lyphan indikator-Papier) und 16 bis 24 Stdn. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde einrotiert, mit 1 ml Ameisensäure aufgenommen, mit Wasser auf 20 ml verdünnt und über P-Zellulose chromatographiert.

c. Carboxypeptidase A

Die Carboxypeptidase A zeichnet sich dadurch aus, daß sie zumeist nur einige wenige Aminosäuren abspaltet und dann "stehen bleibt". Das ist spätestens bei einer der Aminosäuren: Lys, Arg, Pro oder Cys der Fall. Lange Inkubationszeiten führen deswegen nicht zu unübersichtlichen Ergebnissen, wie das bei der Aminopeptidase M leicht möglich ist.

1 bis 2 µmole des Peptids (oder Proteins) werden in 2 ml Wasser aufgenommen und mit 1 bis 2 Tropfen 0,1 n Natronlauge alkalisch gemacht. Dazu gibt man die Lösung von 200 γ Carboxypeptidase A in 0,2 ml 2 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung und inkubiert 12 bis 16 Stdn.. Anschließend wird eingefroren und lyophilisiert. Für die Aminosäureanalyse wird dann sofort in saurem Puffer aufgenommen.

d. Aminopeptidase M

Da das Enzym nicht, wie alle übrigen verwendeten Enzyme, molekular einheitlich ist und weil es obendrein einen erheblichen Aktivitätsverlust mit der Zeit erleidet, ist man zur Charakterisierung auf die Bestimmung von Einheiten angewiesen. Die Anzahl der Einheiten ist jedoch wegen der stark unterschiedlichen Substrataffinitäten in Abhängigkeit von den terminalen Aminosäuren auch kein brauchbarer Hinweis für die zu wählenden Inkubationszeiten. Aus diesen Gründen wurden stets Versuchsreihen angesetzt. Als Standard hat sich dabei folgende Zeitreihe bewährt: 30 Minuten, 1, 2 und 4 Stdn.

Etwa 4 µmole des Peptids (bei großen Peptiden mehr, bis zu 10 µmole bei Proteinen) wurden in 10 ml 0,01 m Natriumdihydrogenphosphat-Lösung gelöst und mit 0,01 n Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt (Lyphan Indikator-Papier). Darauf wurden, je nach Alter des Enzyms, 50 bis 200 γ des Enzyms in 1 ml Phosphatpuffer hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 2,5 ml abpipettiert und mit 0,5 ml Eisessig stark angesäuert. Bis zur Aminosäureanalyse, für die die Lösungen direkt verwendet werden können, wurden sie in der Tiefkühltruhe aufgehoben. Zuerst wurde, je nach vermuteter terminaler Aminosäure, die ein- oder zweistündige Inkubation analysiert. Weitere Analysen richteten sich nach den hierbei erhaltenen Ergebnissen.

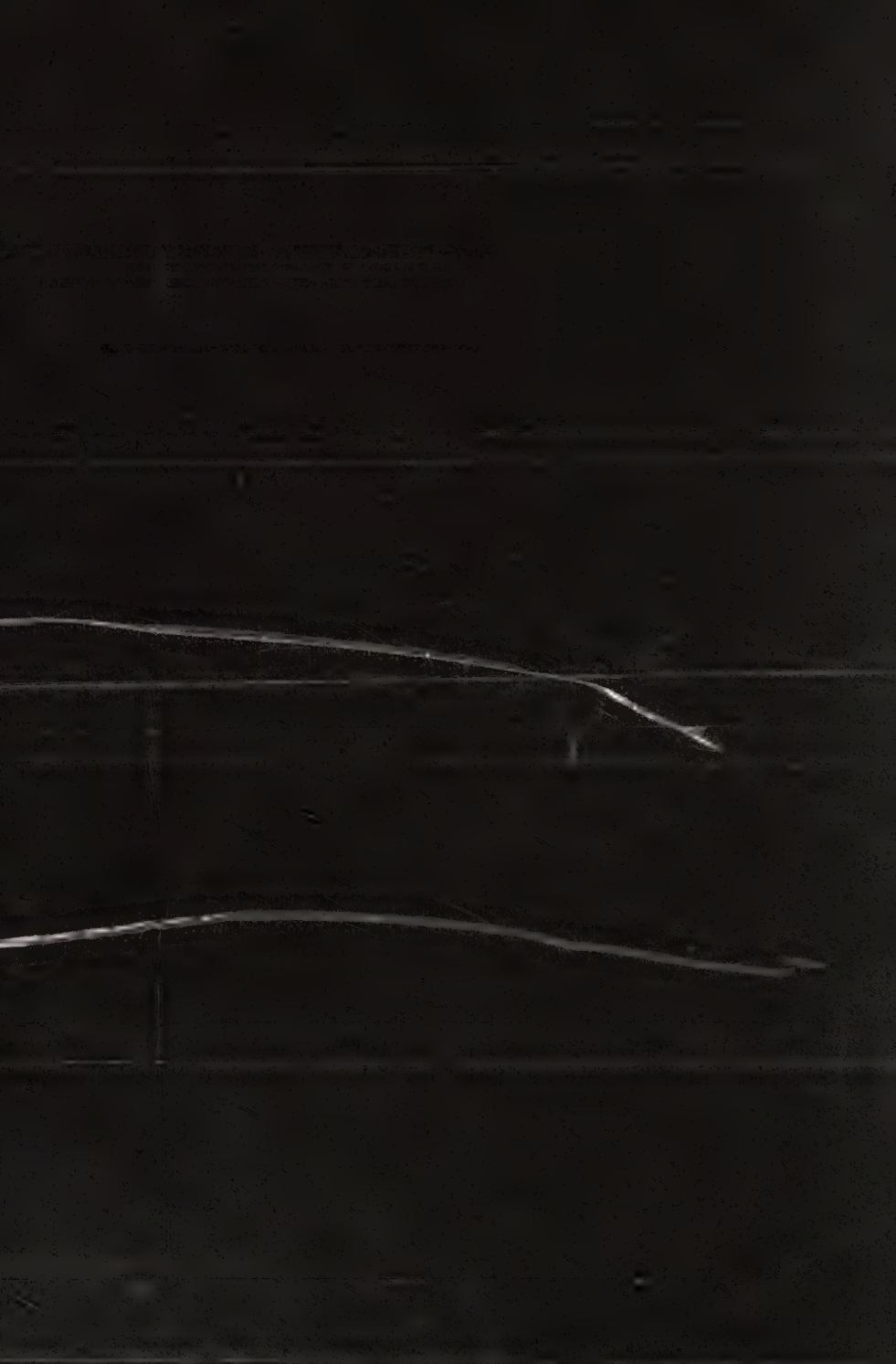
Zusammenfassung

Durch tryptische Spaltung verschiedener Derivate des ß-Lactoglobulins wurden alle Peptide gewonnen, die erforderlich sind, um die Gesamtproteinuntereinheit daraus zusammenzusetzen.

Die Reihenfolge der tryptischen Peptide in der Kette konnte aus 45 unterschiedlichen peptischen Peptiden ermittelt werden, die aus zwei Derivaten des ß-Lactoglobulins hergestellt worden waren. Es wurde eine Partialformel des ß-Lactoglobulins aufgestellt, der alle isolierten tryptischen und peptischen Peptide eindeutig und widerspruchslos zugeordnet werden konnten. Damit ist die gegebene Partialformel weitgehend gesichert.

Das ß-Lactoglobulin bildet eine Kette aus 162 Aminosäuren, von denen 71 in der Partialformel, durch Überlappung oder Edman-Abbau der ihr zugrundeliegenden Peptide, einer eindeutigen Position zugewiesen werden konnten.

Bereits erkennbare Sequenzen machen es wahrscheinlich, daß das ß-Lactoglobulin ein rudimentäres Protein ist, das früher enzymatische Eigenschaften hatte.



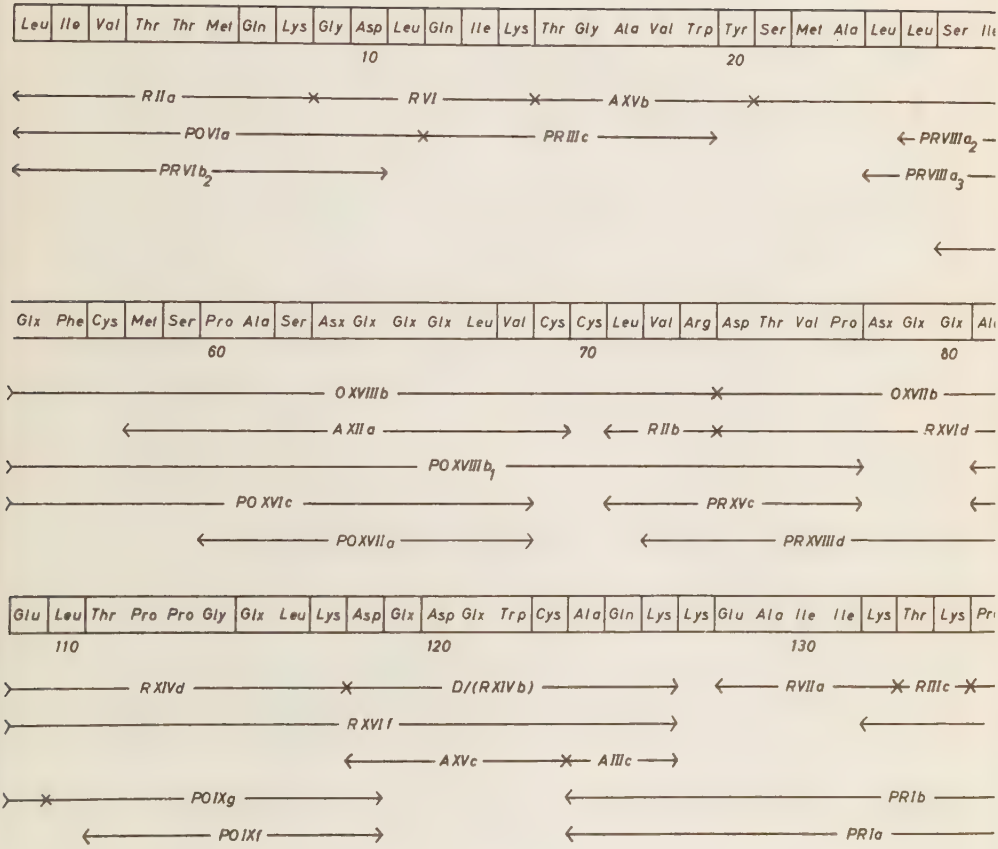
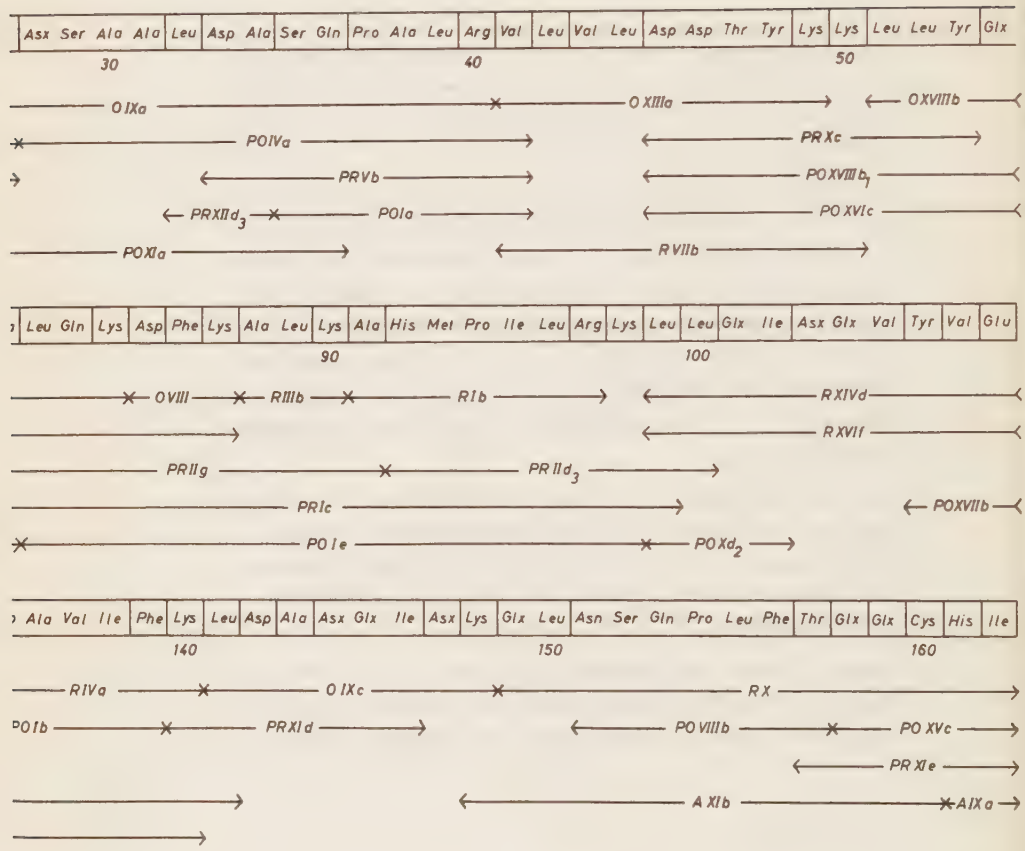


Abb. 11: Partialformel des ß-Lactoglobulins A (mit den wichtigsten Peptiden die zu ihrer Aufstellung führten).

Beim ß-Lactoglobulin B sition 68 gegen Alanin säure in Position 120-1 getauscht.



ist das Valin in Po- und die Asparagin- 22 gegen Glycin aus-

Aminosäuren zwischen zwei senkrechten Strichen können in ihrer Reihenfolge in der Kette untereinander noch ausgetauscht werden. Peptide sind durch liegende Striche angedeutet, die tryptischen Peptide finden sich in der oberen Zeile.

Literaturverzeichnis

1) W. Gilbert und B. Mueller-Hill, Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1891 (1966)

2) M. Ptashne, Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 306 (1967)

3) A. H. Palmer, J. biol. Chemistry 104, 359 (1934)

4) D. W. Green, J. C. Doppola, R. M. Simmons und R. Aschaffenburg, Acta crystallogr. (Copenhagen) 16, A 76 (1963)

5) S. N. Timasheff und R. Townend, J. Amer. chem. Soc. 83, 470 (1961)

6) W. G. Gordon, J. J. Basch und E. B. Kalan, J. biol. Chemistry 236, 2908 (1961)

7) K. A. Piez, E. W. Davie, J. E. Folk und J. A. Gladner, J. biol. Chemistry 236, 2912 (1961)

8) E. B. Kalan, R. Greenberg, M. Walter und W. G. Gordon, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 16, 199 (1964)

9) H. Fraenkel-Conrat, J. Amer. chem. Soc. 76, 3606 (1954).

10) C. I. Nin und H. Fraenkel-Conrat, J. Amer. chem. Soc. 77, 5882 (1955)

11) E. B. Kalan, W. G. Gordon, J. J. Basch und R. Townend, Arch. Biochem. Biophys. 96, 376 (1962)

12) R. Townend, Arch. Biochem. Biophys. 109, 1 (1965)

13) F. M. Robbins und M. J. Kronman, Biochem. Biophys. Acta 82, 186 (1964)

14) G. R. Stark und D. G. Smyth, J. biol. Chemistry 238, 214 (1963)

15) M. A. Raftery und R. D. Cole, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 10, 467 (1963)

16) B. Liebold und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 314, 271 (1959)

17) V. Rudloff und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 323, 129 (1961)

18) R. J. Block, E. L. Durrum und G. Zweig, Paperchromatography and Paperelectrophoresis, Academic Press, New York 1958, p. 128 - 139.

19) V. M. Ingram, Biochem. Biophys. Acta 28, 539 (1958)

20) H. Zuber, Chinia 14, 405 (1960)

21) J. R. Shelton und W. A. Schroeder, J. Amer. chem. Soc. 82, 3342 (1960)

22) F. A. Anderer, H. Uhlig, E. Weber und G. Schramm, Nature 186, 922 (1960)

23) H. E. Schultze, N. Heimburger und G. Frank, Biochem. Z. 336, 388 (1962)

Lebenslauf

Am 16. November 1935 wurde ich in Hamburg geboren. Meine Eltern sind der Buchhalter Carl Frank und seine Ehefrau Gertrud geb. Brasch.

Ich habe die Grundschule besucht und seit April 1947 die Oberschule für Jungen im Alstertal in Hamburg, wo ich 1955 die Reifeprüfung bestand.

Nach zweieinhalb-jähriger Laborantenlehre bei der Firma P. Beiersdorf u. Co. A.G. in Hamburg begann ich im Wintersemester 1957/58 an der Universität Hamburg das Chemiestudium. Das Vordiplom bestand ich dort im Mai 1961 und ging noch in demselben Semester an die Philipps-Universität in Marburg/Lahn, wo ich im Oktober 1963 die mündliche Diplomprüfung ablegte.

Durch regelmäßige Ferienarbeit bei meiner Lehrfirma und später bei den Behringwerken in Marburg erwarb ich einen erheblichen Teil meiner Fachkenntnisse, besonders moderner Methoden und der dazu gehörigen Geräte, die die Universitäten mir nicht vermitteln konnten.

Die Diplomarbeit machte ich, mit Erlaubnis des Dekans der Marburger Fakultät, Herrn Prof. Dr.K. Dimroth, im Max-Planck-Institut für Biochemie in München und bekam das Diplom der Philipps-Universität am 3. Juli 1965.

Am 1. Oktober 1965 heiratete ich meine jetzige Frau Erika, geb. Ballauff aus Iserlohn.

Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden von 1965 bis 1967 im Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.